DS

IN VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON INTERLEUKIN 2 AUF MENSCHLICHE T-LYMPHOCYTEN

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

DOROTHEA KRAUß–PETRUSCHKE

aus Leverkusen

BONN 1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546507_0007

IN VITRO UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON INTERLEUKIN 2 AUF MENSCHLICHE T-LYMPHOCYTEN

INAUGURAL–DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von

DOROTHEA KRAUß–PETRUSCHKE

aus Leverkusen

BONN 1985

Angefertigt mit Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. H. G. Trüper

2. Referent: Prof. Dr. H. Egli

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.1985

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie

und Bluttransfusionswesen der Medizinischen Fakultät

der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. H. Egli

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 7
1.1. Allgemeine Zusammenhänge in der Immunreaktion 7
1.2. T-Lymphocyten 8
1.3. Lymphokine 9
1.3.1. Interferone 9
1.3.2. Interleukine 10
1.4. Klinische Bedeutung von Interleukin 2 13
1.5. DNA-abhängige RNA-Polymerasen 13
1.6. Zielsetzung der Arbeit 16

2. Material und Methoden 17
2.1. Material 17
2.2. Medien und Lösungen 18
2.3. Interleukin 2 (IL 2) Herstellung nach NOVOGRODSKY et al. (1980) 19
2.3.1. Lymphocytenisolierung zur IL 2-Herstellung 19
2.3.2. Aufarbeitung der Kulturüberstände 20
2.3.3. Vorbereitung der Gelfiltration 20
2.3.4. Gelfiltration des Dialysats 21
2.3.5. Proteinbestimmung nach ESEN 21
2.3.6. Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese 22
2.4. Interleukin 2 (IL 2) Nachweis $\hat{=}$ Lymphocyten-proliferationstest 23
2.5. Definition des IL 2-Laborstandards 23
2.6. Leukocytenisolierung 24
2.6.1. Leukocytenisolierung zur Aktivierung von T-Lymphocyten durch 1 % PHA + 20 % IL 2-Medium 24
2.6.2. Leukocytenisolierung zur Aktivierung von T-Lymphocyten durch eine Lymphocyten-Mischkultur (MLC) 25
2.7. Vermehrung aktivierter T-Lymphocyten durch Zugabe von 20 % Interleukin 2 in regelmäßigen Abständen 25

2.8. Messung der Lymphocytenaktivität durch Einbau von radioaktiv markiertem ^{3}H-Thymidin in die DNA der Zellen oder durch Einbau von radioaktiv markiertem ^{3}H-Uridintriphosphat (^{3}H-UTP) in die RNA 26

2.9. Isolierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen Interleukin 2-abhängiger, aktivierter T-Lymphocyten 26

2.9.1. Isolierung der Lymphocytenkerne 26

2.9.2. Aufarbeitung der Kerne und der Cytoplasmafraktion 27

2.10. Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephadex A 25 und Gradienten Elution 28

2.11. Enzymtest 28

2.12. Identifizierung der T-Lymphocyten Subpopulation mit FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern 29

2.13. Autoradiographie-Darstellung des Einbaus von ^{3}H-Thymidin und ^{3}H-UTP in aktivierte, Interleukin-2-abhängige T-Lymphocyten 30

2.14. Vitalitätstest 32

2.15. Interferontest nach der CPE-Reading Methode 32

3. Ergebnisse 34

3.1. Interleukin 2 (IL 2)-Herstellung, modifiziert nach NOVOGRODSKY et al. (1980) 34

3.2. Austestung der Interleukin 2 (IL 2)-Konzentration zur Erhaltung von IL 2-abhängigen T-Lymphocyten in Langzeitkulturen 41

3.3. Mixed Lymphocyte Culture (MLC) 45

3.4. Wachstumsverhalten MLC-aktivierter T-Lymphocyten in Langzeitkultur 48

3.5. Aktivierung von Interleukin (IL 2)-abhängigen T-Lymphocyten 52

3.6. PHA-Abhängigkeit aktivierter T-Lymphocyten in Langzeitkultur nach Vorstimulierung mit 1 % PHA und 20 % Interleukin 2 (IL 2)-Medium 54

3.7. Wachstum von PHA-aktivierten T-Lymphocyten in Langzeitkultur 56

3.8. Identifizierung der Subpopulationen PHA-aktivierter T-Lymphocyten durch FITC-konjugierte monoklonale Antikörper 63

3.9. Säulenchromatographische Darstellung DNA-abhängiger RNA-Polymerasen in PHA-aktivierten T-Lymphocyten 65

3.10. Autoradiographische Darstellung von Interleukin 2 (IL 2)-abhängigen T-Lymphocyten 77

3.11. Tabellarischer Anhang (Tab. 8 - 22) 85

4. Diskussion

4.1. Herstellung von Interleukin 2 96

4.2. Wachstumsverhalten von Interleukin 2-abhängigen T-Zellen in Langzeitkultur 100

4.3. RNA-Synthese von Interleukin 2-abhängigen T-Zellen 107

5. Zusammenfassung 113

6. Literaturverzeichnis 116

1. EINLEITUNG

1.1.
Allgemeine Zusammenhänge in der Immunreaktion

Die Immunabwehr des Menschen stellt ein sehr komplexes Geschehen dar, bei dem die Lymphocyten eine entscheidende Rolle spielen.
Wir kennen zwei Formen der spezifischen Immunreaktion des menschlichen Körpers:
a) die humorale Immunantwort
b) die zelluläre Immunantwort.

Bei der humoralen Immunität regt ein als fremd erkannter Stoff, das Antigen oder Immunogen, bestimmte Zellen des immunologischen Apparates zur Sekretion von Antikörpern (Immunglobuline) an.
Bei der zellulären Immunität binden die dafür verantwortlichen Zellen das Antigen mittels komplementärer Oberflächenrezeptoren und reagieren darauf durch die Bildung von Mediatorstoffen (Lymphokinen).
Eine zusätzliche, wesentliche Funtkion des Immunsystems ist sein sogenanntes immunologisches Gedächtnis.
Die Vermittlung sowohl der humoralen und zellulären Immunantwort, als auch die "Gedächtnisfunktion" beruhen auf der Leistung von Zellen des lymphatischen Systems (FITCH und CEROTTINI, 1982).

Man unterscheidet zwischen primären und sekundären lymphatischen Organen. Bei den Säugern ist der Thymus das einzige identifizierte primäre lymphatische Organ. Es ist ein Gewebe, das die Reifung der die zelluläre Immunität vermittelnden Lymphocyten (T-Lymphocyten) von undifferenzierten Vorläuferzellen zu immunkompetenten T-Lymphocyten gewährleistet.

Die Entwicklung von zur Antikörpersynthese befähigten Lymphocyten (Bursa-abhängige Lymphocyten, B-Lymphocyten) geschieht in der Bursa Fabricii bei Vögeln, wobei die primäre Bildungsstätte der B-Lymphocyten

beim Säugetier bislang unbekannt ist. Es wird vermutet, daß die Reifung der B-Lymphocyten in verschiedenen Organen erfolgt, wie etwa der Leber, Milz und dem Knochenmark.
Die sekundären lymphatischen Organe, wie die Milz und die Lymphknoten, fangen den größten Teil der anfallenden Antigene ab und präsentieren sie in geeigneter Form den mononukleären Phagocyten sowie den B- und T-Lymphocyten. Die überwiegende Mehrheit der mononukleären Phagocyten stammt aus dem Knochenmark, wo die Vorläuferzellen zu Monocyten heranreifen. Diese gelangen in die Zirkulation und können anschließend in die Gewebe einwandern, wo sie als Macrophagen bzw. Histiocyten bezeichnet werden. Neben den eigentlichen immunkompetenten Zellen, den B- und den T-Lymphocyten, ist der Macrophage als akzessorische Zelle für eine optimale Immunantwort erforderlich (LOHMANN-MATTHES, 1981).

1.2.
T-Lymphocyten

Drei verschiedene Subpopulationen der T-Lymphocyten können unterschieden werden: T-Helfer-Zellen (HTL); T-Suppressor-Zellen (STL) und Cytotoxische-T-Zellen (CTL).

Die T-Helfer-Zellen sind zur Differenzierung der B-Lymphocyten zur Antikörper-produzierenden Zelle und der Suppressor/Cytotoxischen-T-Zellen notwendig (BACH et al., 1973; WAGNER et al., 1973).
T-Helfer-Zellen besitzen neben den T_1- und T_3-Antigenen das T_4-Antigen.

Die T-Suppressor-Zellen können die Funktion der B-Lymphocyten unterdrücken. Sie besitzen neben den T_1- und T_3-Antigenen das T_8-Antigen.
Durch die Unterdrückung der humoralen Immunantwort können die T-Suppressor-Zellen eine wichtige regulatorische Funktion erfüllen (KELLER, 1981).

Die Cytotoxischen-T-Zellen (CTL) sind die dritte bekannte Subpopulation der T-Lymphocyten. Die wesentliche Eigenschaft der CTL besteht darin, daß sie im direkten Kontakt Zellen abtöten können, die ein spezifisches Antigen

tragen. Sie besitzen die gleichen Oberflächenantigene, wie die Suppressor-Zellen (T_1, T_3 und T_8).

Bei 5 - 10 % der Lymphocyten handelt es sich um Zellen, die die wichtigsten Oberflächenmerkmale der T- und B-Zellen nicht ausprägen. Man bezeichnet sie als Null-Zellen. Da sie auf Zielzellen, die Immunglobuline G tragen, cytotoxisch wirken, werden sie auch als Killer- bzw. Natural Killer (NK)-Zellen bezeichnet.
Untersuchungen haben gezeigt, daß es sich bei den NK-Zellen um Promonocyten handelt, also um die Vorläuferzellen der Macrophagen (LOHMANN-MATTHES, 1981).

1.3.
Lymphokine

Das optimale Zusammenwirken der T-Zell-Subpopulationen mit den B-Zellen und Monocyten (Macrophagen) ist die Voraussetzung für eine intakte Immunreaktion.
Die genauen Mechanismen über das Zusammenwirken zellulärer und humoraler Faktoren, die zu T-Zell-vermittelten cytotoxischen Immunreaktionen führen, sind noch nicht völlig geklärt. Es ist jedoch bekannt, daß neben einem direkten Zellkontakt freigesetzte lösliche Mediatoren, die Lymphokine, eine entscheidende Funktion haben.
Lymphokine sind lösliche Gykoproteine, die von verschiedenen zur Immunreaktion beitragenden Zelltypen auf einen spezifisch antigenen Reiz hin produziert werden und die funktionelle Aktivität anderer Zellen - und damit den Verlauf der Immunantwort - beeinflussen (OPPENHEIM et al., 1981).

Bisher sind zwei Gruppen von Lymphokinen bekannt:
a) die Interferone und
b) Interleukine.

1.3.1.
Interferone

Für Interferon ist eine generelle cytostatische Wirkung neben anderen vielfältigen regulatorischen Einflüssen besonders charakteristisch. Es werden zwei Subtypen von Interferonen unterschieden. Zum Interferontyp I zählen α-Interferon - oder Leukocyten-Interferon -, von Leukocyten gebildet - ,

und β -Interferon - oder Fibroblasten-Interferon -, welches aus Bindegewebszellen stammt. Sowohl α -Interferon als auch β -Interferon werden ausschließlich auf virale Reize hin gebildet.
γ -Interferon (γ -IFN) - oder Immuninterferon - gehört zum Interferontyp II. Bezüglich der Hemmwirkung auf die humorale Immunantwort ist es wesentlich aktiver, als virusinduziertes Typ I Interferon. Seine Bildung erfolgt durch die Cytotoxischen-T-Lymphocyten-(CTL)-Vorläuferzellen auf einen Antigen/Mitogen-Reiz hin. Immuninterferon ist für die Proliferation der T-Suppressor/Cytotoxischen-T-Zellen mit verantwortlich. Weiterhin bewirkt es eine verstärkte Ausbildung der Interleukin 2-Rezeptoren auf T-Lymphocyten (FARRAR et al., 1981; TING et al., 1982; JOHNSON und FARRAR, 1983).

1.3.2.
Interleukine

Interleukin 1 (IL 1)
Beim Interleukin 1 handelt es sich um den "Lymphocyte-Activating-Factor" (LAF), der von GERY und Mitarbeitern (1972) zum ersten Mal beschrieben wurde. Es wird von Macrophagen auf einen Antigen/Mitogen-Reiz hin gebildet und ausgeschieden (OPPENHEIM et al., 1981). In der Immunabwehr steht es in engem Zusammenhang mit Interleukin 2.

Interleukin 2 (IL 2)
Human-Interleukin 2 ist ein lösliches, nicht antigenspezifisches Glykoprotein, mit einem Molekulargewicht von ca. 15 000. Es wird in vitro von T-Helfer-Zellen produziert. Die Aktivierung der T-Helfer-Zellen zur Interleukin 2 (IL 2) Synthese ist abhängig von Interleukin 1 (IL 1) und von einem durch Macrophagen präsentierten Antigen.

1976 wurde zum ersten Mal das IL 2 beschrieben, was zu dieser Zeit noch als T-Zell-Wachstumsfaktor (TCGF) bezeichnet wurde (MORGAN et al., 1976, RUSCETTI et al., 1977).
Nachfolgende Arbeiten zeigten, daß Antigen-spezifische Mäuse- und Human-cytotoxische T-Zellen in vitro kultiviert werden konnten, sofern in ihrem Kulturmedium TCGF enthalten war. TCGF wurde aus Überständen Mitogen-stimulierter Lymphocyten Kulturen gewonnen (GILLIS und SMITH, 1977; KASAKURA, 1977; STRAUSSER und ROSENBERG, 1978; WATSON, 1979).
1979 einigte man sich auf die Bezeichnung Interleukin 2 für den T-Zell-

Wachstumsfaktor TCGF, der zu der Zeit unter zahlreichen weiteren Synonymen beschrieben wurde (AARDEN, 1979).
Die auffallendste Eigenschaft des IL 2 ist seine Fähigkeit, die klonale Vermehrung aller T-Lymphocyten zu fördern, die einen Rezeptor für IL 2 besitzen. Es hat also die Eigenschaft, neben dem "Helfer"-Effekt für die Differenzierung von Cytotoxischen-T-Lymphocyten, diese Zellen, wenn sie zu funktionstüchtigen Effektorzellen ausgereift sind, über längere Zeit in einem exponentiellen Wachstum zu halten. Die proliferierenden Zellen behalten dabei ihre cytotoxischen Eigenschaften (RYSER et. al., 1978; WAGNER und RÖLLINGHOFF, 1978; OKADA und HENNEY, 1980).
Die Vorstellungen über die Aktivierung der T-Lymphocyten durch Lymphokine sind in Abb. 1 dargestellt.

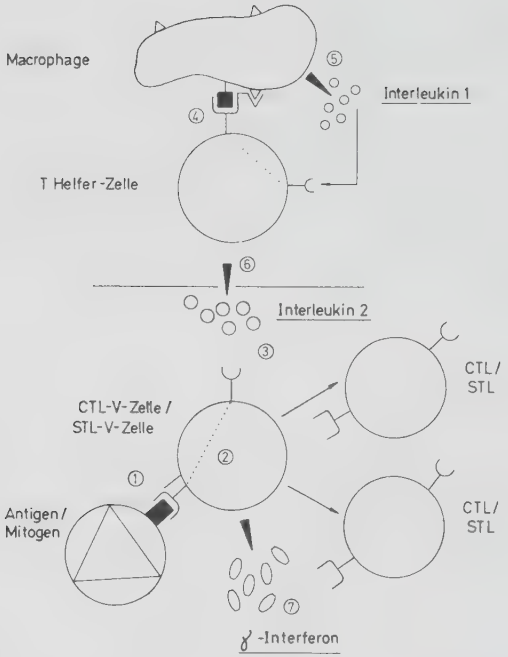


Abb. 1: Aktivierung der Differenzierung von T-Vorläufer- zu T-Effektorzellen durch Interleukine

(1) Antigen/Mitogen Kontakt
(2) Expression von Rezeptoren für IL 2
(3) Funktionelle Differenzierung zu Effektorzellen und klonale Expansion
(4) Antigen/Mitogen Präsentation durch Macrophagen
(5) Ausscheidung von IL 1 und Aktivierung der T-Helfer-Zelle
(6) Produktion von IL 2
(7) Bildung von Interferon

1.4.

Klinische Bedeutung von Interleukin 2

Das Interleukin 2 (IL 2) wirkt regelnd und modulierend auf die natürlichen Abwehrmechanismen eines Körpers ein. Es stimuliert insbesondere die Vermehrung der T-Suppressor-Zellen/CTL. Ist die Vermehrung oder Differenzierung der lebenswichtigen T-Lymphocyten gestört, bewirkt dies eine bedrohliche Schwächung der körpereigenen Abwehr. Solche Immundefekte können genetisch bedingt oder durch teilweise noch unbekannte Faktoren erworben sein. Ein Beispiel hierfür ist das AIDS-Syndrom (Acquired Immune Defiency Syndrome), das vermutlich durch LAV-HTL-V-III Viren verursacht wird (Human T-cell leukemia-Virus) (POPOVIC et al., 1984).
Bei den unterschiedlichen Immunmangelkrankheiten verspricht man sich durch den therapeutischen Einsatz von Interleukin 2 eine positive Beeinflussung der Immundefekte.
An Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß eine in vivo Applikation von IL 2-haltigem Material einen immunstimulierenden Effekt hat (BONNARD und ALVAREZ, 1980). Ein von WAGNER und Mitarbeitern beschriebenes Beispiel zeigte, daß die Injektion von IL 2 in Mäuse mit einem funktionellen T-Zell-Defekt die Wiederholung ihrer Fähigkeit bewirkte, CTL gegen Allo-Antigene zu bilden (WAGNER et al., 1980).
Da es sich bei IL 2, wie bei den Interferonen, um ein Protein handelt, das in äußerst niedrigen Konzentrationen im Körper vorkommt, liegt es nahe, diesen Immunmodulator mit den neuen Methoden der Gentechnologie in größeren Mengen herzustellen.
Wie lange es noch dauern wird, ehe IL 2 wirksam in der Human Medizin eingesetzt werden kann, ist ungewiß. Das angesehene "Stanford Research Institute" (SRT in Menlo Park, Californien) schätzt, daß eine Markteinführung der Interleukine als ausreichend erprobte Medikamente - wenn überhaupt - frühestens in den 90er Jahren möglich sein dürfte.

1.5.

DNA-abhängige RNA-Polymerasen

Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen sind Enzyme, die eine "Schlüsselfunktion" bei der Transkription haben. Sie gehen dabei Interaktionen mit DNA und anderen Chromatin-Komponenten des eukaryotischen Genoms ein (BULL und GARRIDO, 1982). Eine genaue Kenntnis ihrer Struktur ist erfor-

derlich für das Verständnis von Regulationsmechanismen, denen eine Zelle bei so unterschiedlichen Prozessen, wie Differenzierung oder Immunantwort, unterworfen ist.

1959 konnten WEISS und GLADSTONE zum ersten Mal die Existenz eines RNA-synthetisierenden Systems in Kernen von Rattenleberzellen nachweisen. Kurze Zeit später wurde von mehreren Arbeitsgruppen gleichzeitig ein bakterielles RNA-synthetisierendes Enzym gefunden, von dem gezeigt werden konnte, daß es DNA-abhängig ist (HURWITZ et a., 1960).

In eukaryotischen Systemen hingegen müssen wir drei verschiedene RNA-Polymerasen unterscheiden, die in verschiedenen Regionen des Zellkerns lokalisiert sind und denen eine unterschiedlich funktionelle Bedeutung zukommt (ROEDER, 1976; BULL und GARRIDO, 1982).

Die RNA-Polymerasen können entweder frei oder an das Chromatin gebunden vorkommen (RAUL et al., 1983).

Die Abbildung 2 zeigt zum einen das Schema vom Aufbau eines Chromosoms und zum anderen die Funktionsorte der verschiedenen RNA-Polymerasen.

Die RNA-Polymerase I (RNA-P. I) ist im Nucleolus lokalisiert und katalysiert die Synthese der ribosomalen (18 S, 28 S) RNA (r RNA) mit Ausnahme der 5 S RNA.

Die 5 S RNA wird zusammen mit der Transfer RNA (t RNA) von der RNA-Polymerase III (RNA-P. III) aufgebaut.

Für die Synthese der hn RNA (Vorläufer RNA der messenger RNA) (m RNA) ist die RNA-Polymerase II (RNA-P. II) verantwortlich (KÖSSEL, 1982).

Strukturuntersuchungen, die bisher an eukaryotischen Enzymen durchgeführt wurden, ergeben einen höheren Grad an Komplexität als bei den bakteriellen Enzymen.

Untersucht wurden bisher die RNA-Polymerasen aus Hefe, pflanzlichen und tierischen Geweben sowie Zellkulturen (JENDRISAC et al., 1976; SENTENAC et al., 1976; SEKIMIZU et al., 1979; BULL und GARRIDO, 1982; FALCK-PEDERSEN et al., 1983).

Die drei RNA-Polymerase Klassen lassen sich durch α-Amanitin, das Gift des Knollenblätterpilzes Amanita phalloides, in ihren Funktionen unterschiedlich hemmen (SEIFART und SEKERIS, 1969).

COCHET-MEILHAC und CHAMBON (1974) konnten zeigen, daß α-Amanitin mit den RNA-Polymerasen in Interaktion tritt und die Elongation der Transkription verhindert.

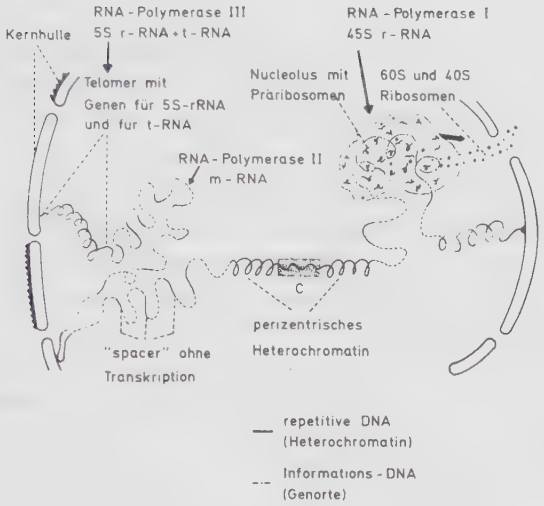


Abb. 2: Funktion der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen in einer eukaryontischen Zelle.

RNA-Polymerase II wird bereits durch geringe Mengen α-Amanitin (1 µg/ml) gehemmt. RNA-Polymerase III läßt sich erst durch hohe Konzentrationen α-Amanitin (200 µg/ml) hemmen und die RNA-Polymerase I bleibt unempfindlich (WEINMANN und ROEDER, 1974; KAWAHATA et al., 1983).

Da ein entscheidender Faktor für das Verhalten jeder Zelle seine RNA-Synthese ist, die wiederum auf der Funktion der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen beruht, wurden diese Enzyme zur Charakterisierung der Interleukin 2-abhängigen T-Lymphocyten herangezogen.

1.6.
Zielsetzung der Arbeit

Über die Wirkung auf Interleukin 2-abhängige T-Zellen in Zellkulturen wurde in der Literatur wenig berichtet. Es war das Ziel dieser Arbeit, Zellkulturen Interleukin 2-abhängiger T-Zellen näher zu untersuchen. Dazu gehörten:

1. Herstellung eines mitogenfreien, gereinigten Interleukin 2.
2. Aktivierung und Erhaltung von T-Lymphocyten in Langzeitkulturen.
3. Untersuchung der Kulturbedingungen für die Langzeitkulturen.
4. Charakterisierung des Wachstumsverhaltens der Interleukin 2-abhängigen T-Zellen in Kulturen.
5. Charakterisierung der Lymphocyten Subpopulationen, die sich während der Langzeitkulturen bilden, durch Darstellung mit monoklonalen Antikörpern.
6. Bestimmung der RNA-Polymerasen:
   - in intakten T-Lymphocyten
   - durch Autoradiographie
   - durch chromatographische Auftrennung.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1.

Material:

α-Amanitin, Nucleotidphosphate -	BOEHRINGER GmbH, Mannheim
Dithiotreitol -	SIGMA CHEMIE GmbH, München
Phytohaemagglutinin (PHA) - Dextran T 500, DEAE Sephadex A 25	PHARMACIA FINE CHEMICALS, Schweden
(5-^{3}H)-Uridin 5'-Triphosphat, - (^{3}H-UTP), 12,4 Ci/mMol (Methyl-^{3}H)-Thymidin (^{3}H-Thymidin), 25 Ci/mMol	AMERSHAM-BUCHLER GmbH, Braunschweig
Liquemin 25000 -	HOFFMANN LA ROCHE AG, Grenzach-Whylen
Lymphoflot -	BIOTEST SERUMINSTITUT GmbH, Frankfurt/M.
RPMI-1640, Filtermatten -	FLOW LABORATORIES GmbH, Meckenheim
Aqualuma -	J.T. BAKER, England

Alle übrigen Chemikalien sind bei den bekannten Herstellern erhältlich.

2.2.

Medien und Lösungen

Dextranlösung:	4 % Dextran T 500 in 0,97 M NaCl
RPMI-1640-1:	RPMI-1640 auf 500 ml + 55 mg Streptomycin + 55000 I.U. Penicillin + 1,2 mMol Glutamin
RPMI-1640-2:	RPMI-1640 + 20 mMol HEPES auf 500 ml + 55 mg Streptomycin + 55000 I.U. Penicillin + 1,2 mMol Glutamin + 1,25 % Na-Bicarbonat
MKS-Puffer-1:	2 mM $MgCl_2$ 0,4 mM KH_2PO_4 pH 6,7 320 mM Saccharose
MKS-Puffer 2:	2 mM $MgCl_2$ 0,4 mM KH_2PO_4 pH 6,7 640 mM Saccharose
RSB-Puffer:	10 mM TRIS-HCl pH 8,0 10 mM NaCl 1,5 mM $MgCl_2$
TES-Puffer:	10 mM TRIS-HCl pH 8,0 5 mM EDTA 250 mM Saccharose
TGED-Puffer:	50 mM TRIS-HCl pH 8,0 0,5 mM EDTA 1 mM DTT 20 % Glycerin 87%ig

TGED$^+$-Puffer:	50	mM TRIS-HCl, pH 8,0
	0,5	mM EDTA
	1	mM DTT
	20	mM $(NH_4)_2SO_4$
	5	mM $MgCl_2$
	20 %	Glycerin 87%ig
PBS-Puffer:	Phosphat-gepufferte 0,9%ige NaCl-Lösung (FLOW)	

Angaben über weitere Puffer und Lösungen befinden sich im Text.

2.3.

Interleukin 2 (IL 2) Herstellung nach NOVOGRODSKY et al. (1980)

2.3.1.

Lymphocytenisolierung zur IL 2-Herstellung

Die Lymphocytenisolierung erfolgte unter sterilen Bedingungen. 450 ml venöses mit Heparin versetztes Humanblut wurde von Spendern steril abgenommen. Das Blut wurde im Verhältnis 5:1 mit 4%iger Dextranlösung in 50 ml Zentrifugen-Röhrchen vermischt und in einer Winkelstellung von 45 °C (Winkelständer) bei 37 °C und 5 % CO_2 30 Minuten inkubiert. Der entstandene Überstand (zellhaltiges Plasma) wurde auf je 15 ml Ficoll Isopaque (Lymphoflot, BIOTEST) geschichtet und 13 Minuten bei 36 x g und unmittelbar anschließend 15 Minuten bei 560 x g zentrifugiert (SORVALL GLC-2B). Der zwischen dem Lymphoflot und dem Serum entstandene Leukocytenring wurde abgehoben und zweimal mit RPMI-1 gewaschen (10 Minuten, 360 x g). Die Röhrchen wurden nach dem letzten Waschgang ausgeleert und das Sediment mit PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und auf 1,5 x 10^7/ml eingestellt. 50 U/ml Neuraminidase und 2,6 U/ml Galactoseoxidase wurden unter die Zellen gemischt und 30 Minuten im Wasserbad bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen dreimal in PBS gewaschen (10 Minuten, 360 x g). Die Zellzahl wurde erneut bestimmt und auf 1 x 10^6/ml in RPMI-2 + 1 % inaktiviertes AB-Serum (BIOTEST) eingestellt.

Die Zellkulturen wurden in 80 ml Kulturflaschen (FALCON) gefüllt und 44 Stunden bei 37 °C, 5 % CO_2 inkubiert. Die Kulturüberstände wurden anschließend entnommen und 10 Minuten bei 360 x g zentrifugiert. Die Überstände nach der Zentrifugation wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 70 °C gelagert.

2.3.2.
Aufbereitung der Kulturüberstände

Die Kulturüberstände wurden aufgetaut, vereinigt und bei 2 °C in einem Amicon-Ultrafilter 4-fach eingeengt. Es handelte sich hier um einen Ultrafilter Amicon UF DC 2 Hollow Fiber Cartridge, Type H1 P 5, mit einer Ausschlußmolekülgrenze von 5 000. Die in den eingeengten Kulturüberständen vorhandenen Proteine wurden durch eine Fällung mit 80 % Ammoniumsulfat gewonnen. Nach vollständigem Auflösen des Salzes und Lagerung über Nacht wurden die Kulturüberstände bei 10 000 x g 1 Stunde zentrifugiert. Die Sedimente der Ammoniumsulfatfällung wurden gesammelt und in minimaler Menge 0,05 M HEPES-NaCl-Puffer, pH 7,0 resuspendiert und gegen HEPES-NaCl-Puffer (s.o.) bei + 4 °C dialysiert. Leitfähigkeitsmessungen vor und nach der Dialyse wurden bei 0 °C vorgenommen (WTW-Weilheim).

2.3.3.
Vorbereitung der Gelfiltration

Vorgequollenes AcA 54 Gel (LKB) wurde mehrfach in 0,05 M HEPES-NaCl-Puffer gewaschen und entgast. Eine Gelfiltrationssäule (K-26, PHARMACIA), (Gelbetthöhe 90 cm, ∅ 3 cm) wurde anschließend nach Anleitung der Hersteller gepackt und mit HEPES-NaCl-Puffer eluiert. Das Ausschlußvolumen der Säule wurde mit Blue Dextran 0,1 g in 2 ml HEPES-NaCl-Puffer) ermittelt. Die Säule wurde mit 4 Proteinen bekannten Molekulargewichts geeicht. Es handelte sich um:

Cytochrom C MG	=	12300	(SERVA)
Trypsinogen MG	=	24000	(SERVA)
Ovalbumin MG	=	45000	(SERVA)
Rinderserumalbumin (BSA) MG	=	67000	(SERVA)

Anschließend wurde die Säule gründlich mit HEPES-NaCl-Puffer (s.o.) gewaschen.

2.3.4.

Gelfiltration des Dialysats

Zur Gelfiltration des Dialysats wurden 25 ml aufgetragen. Die Proteinkonzentration betrug 27 mg/ml. Die Durchflußgeschwindigkeit war auf etwa 25 ml/h eingestellt. Die Absorption des Säulendurchlaufs wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Die Fraktionsgröße betrug 3 ml. Eine Proteinbestimmung der Fraktionen wurde nach der Methode von ESEN (2.3.5.) durchgeführt. Die Gelfiltration erfolgte bei 4 ^{o}C.

2.3.5.

Proteinbestimmung nach ESEN (1978)

Lösungen: 10 mg BSA/ml Aqua dest.
Coomassie Blue R 250 1%ig in Aqua dest.
Färbelösung, bestehend aus 585 ml H_2O,
225 ml Isopropylalkohol, 90 ml Essigsäure,
100 ml 1%ige Coomassie Blue Lösung.
Fixierlösung, bestehend aus 1 % SDS in Aqua dest.

Durchführung: Auf SS 2043 Filterpapier wurde in vorgezeichnete Kreise (Ø 1,5 cm) jeweils 5 µl einer zu bestimmenden Probe pipettiert. Anschließend wurde das Filterpapier luftgetrocknet und in Färbelösung überführt, wo es 15 Minuten geschüttelt wurde. Die Färbelösung wurde dann dekantiert und das Filterpapier mit H_2O entfärbt, bis keine Farbwolken mehr entstanden. Anschließend wurde das Filterpapier weitere 3 Minuten in H_2O geschüttelt und dann luftgetrocknet. Die gefärbten Kreise wurden ausgeschnitten und unter Zugabe von 3 ml 1 % SDS-Lösung in Glasröhrchen überführt. Die Proben wurden 15 - 30 Minuten geschüttelt und die so gewonnenen Probenüberstände photometrisch bei 600 nm gegen die Leerwerte gemessen. Durch Erstellung einer Eichgeraden mit Werten bekannter Proteinkonzentrationen konnten die Proteinkonzentrationen der Proben direkt in mg/ml bestimmt werden.

2.3.6.

Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese

1.

Lösungen: SDS-Puffer - wurde nach Anleitung der Firma (BIORAD) hergestellt. SDS (Natriumdodecylsulfat) wurde in 58,7 ml Eisessig vorgelöst, mit 2 l Aqua dest. vollständig gelöst und ad 5 l mit Aqua dest. aufgefüllt.
Sample-Puffer: 20 ml SDS-Puffer (s.o.) wurden mit Aqua dest. im Verhältnis 1:4 verdünnt. Anschließend wurde darin 1 g SDS gelöst. Dithiotreitol (DTT) wurde in einer Endkonzentration von 0,04 M und EDTA in einer Endkonzentration von 0,001 M hinzugegeben.
Puffer für die Standards: 1 g SDS wurde in 100 ml SDS-Puffer (s.o.) gelöst und anschließend 10 ml Glycerin hinzugegeben.
Farblösung: Zu 50 ml Isopropanol wurden 50 ml Eisessig gegeben und mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 25 ml in einer 1%igen Coomassie Blue Lösung (BIORAD) untergemischt.
Fixierlösung: Es wurden 200 ml Isopropanol und 50 ml Eisessig vermischt und mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt.
Entfärbelösung: 500 ml Isopropanol und 500 ml Eisessig wurden gemischt und mit Aqua dest. auf 5 l aufgefüllt.
Es wurde "Biophore Gel" (12 %) für SDS-denaturierte Proteine mit einem Molekulargewicht von 8 000 - 7 000 in Biorad Model 150 A cells verwendet. Die Proteinstandard (LOW MW) lag von der Firma BIORAD vor und wurde unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1 : 20 mit Sample-Puffer verdünnt. Vor dem Auftrag auf die Gele wurden je 2 x 1 ml dieser Lösung 30 Minuten bei 65 ^{o}C und je 2 x 1 ml 5 Minuten bei 100 ^{o}C erhitzt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden jeder Standardlösung 200 µl Tracking-Solution (Bromphenolblau) hinzugefügt. Je 30 µl dieser vorbereiteten Standards wurden bei einem Elektrophoreselauf mitgefahren.

2.

Vorbereitung der Proben und Elektrophorese

Nach der Proteinbestimmung wurde je eine Probe im Verhältnis 1 : 1 mit 10%iger Trichloressigsäure (TCA) gemischt und 1,5 - 2 Stunden bei 4 ^{o}C belassen. In einer Eppendorfzentrifuge wurden die Proben 10 Minuten

zentrifugiert und das Sediment mit einer entsprechenden Menge Sample-Puffer aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug danach 1 mg/ml. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten bei 65 °C inkubiert.
Je 25 µl der Proben und 5 µl Tracking Solution wurden gemischt und auf die Gele aufgetragen.
Bis zum vollständigen Einwandern der Proben wurde eine Spannung von 60 Volt angelegt und pro Gel weniger als 0,2 Watt eingestellt.
Sobald die Proben in das Gel eingewandert waren, wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht (pro Gel weniger als 0,1 Watt). Als Kontrollen dienten die Standards (s.o.).
Nach dem Lauf (ca. 4 - 5 Stunden) wurden die Gele über Nacht fixiert. Die fixierten Gele wurden in der Färbelösung 1,5 Stunden gefärbt und anschließend in einem Rührbad 40 Stunden mit Entfärbelösung entfärbt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele in einem Gelscanner (Modell 1310) überführt und bei 580 nm durchgemessen (30 cm/h).

2.4.
Interleukin 2 (IL 2) Nachweis ≙ Lymphocytenproliferationstest

Interleukin 2 (IL 2)-haltige Proben wurden in Reihe verdünnt und je 100 µl jeder Verdünnung in Mikrotiterplatten (COSTAR) vorgelegt.
Je 100 µl einer IL 2-abhängigen T-Lymphocyten Kultur wurden in einer Endkonzentration von 5×10^5/ml hinzupipettiert. Zusätzlich wurde sowohl eine positive Kontrolle als auch eine negative Kontrolle ohne IL 2 angelegt. Nach 3-tägiger Inkubationszeit wurden die Kulturen mit ^{3}H-Thymidin (1 µCi/Ansatz) markiert und nach weiteren 4,5 Stunden mit einem automatischen Zellernter (FLOW) geerntet und die Thymidineinbaurate in einem Scintillationszähler (BECKMANN) in "counts per minute" (cpm) gemessen.

2.5.
Definition des IL 2-Laborstandards

Für das Interleukin 2 sind noch keine Standardeinheiten definiert. Wir haben daher unseren eigenen Laborstandard hergestellt. Die Angaben in

dieser Arbeit in bezug auf die IL 2-Konzentrationen werden in Volumenprozent angegeben. Der von uns verwendete Laborstandard entspricht dem Pool der IL 2-haltigen Fraktionen nach Gelfiltration (2.3.4.) und wird in dieser Arbeit als IL 2-Medium bezeichnet.

2.6.

Leukocytenisolierung

Die Leukocytenisolierung erfolgte unter sterilen Bedingungen. 20 - 450 ml venöses Humanblut wurde von Spendern abgenommen und mit Heparin versetzt. Die Menge des Blutes hing von der jeweiligen Fragestellung eines Versuches ab. Das Blut wurde im Verhältnis 5:1 mit 4%iger Dextranlösung in Falcon Röhrchen (BECTON DICKINSON) vermischt und in einer Winkelstellung von 45 ^{o} (Winkelständer) bei 37 ^{o}C, 5 % CO_2, 30 Minuten inkubiert. Der entstandene Überstand (zellhaltiges Plasma) wurde auf je 15 ml Ficoll Isopaque (Lymphoflot, BIOTEST) geschichtet und 13 Minuten bei 36 x g und unmittelbar anschließend 15 Minuten bei 560 x g zentrifugiert. Der zwischen dem Lymphoflot und dem Serum entstandene Leukocytenring wurde abgehoben und zweimal mit RPMI-1 gewaschen.

2.6.1.

Leukocytenisolierung zur Aktivierung von T-Lymphocyten durch 1 % PHA + 20 % IL 2-Medium

Die Leukocyten wurden, wie in Kapitel 2.6. beschrieben, isoliert und nach zweimaligem Waschen in RPMI-1 die Zellzahl ermittelt. Eine Zellzahl von $1x10^6$/ml wurde mit RPMI-2 + 10 % inaktiviertes AB-Serum (unter Zugabe von 1 % PHA und 20 % Interleukin 2-Medium) eingestellt. Die Zellkulturen wurden in 80 ml Kulturflaschen (FALCON) verteilt und aufrecht stehend bei 37 ^{o}C, 5 % CO_2, für 5 Tage inkubiert.
PHA (PHARMACIA) wurde in 10 ml sterilem PBS (ohne Ca^{2+} und ohne Mg^{2+} Ionen) gelöst und bei 4 ^{o}C gelagert.

2.6.2.

Leukocytenisolierung zur Aktivierung von T-Lymphocyten durch eine Lymphocyten-Mischkultur (MLC)

Die Leukocyten zweier verschiedener Spender A und B wurden, wie in Kapitel 2.6. beschrieben, isoliert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen des Spenders A in RPMI-1 wurden diese auf eine Zellzahl von $1{,}5 \times 10^7$/ml unter Zugabe von 50 µg Mitomycin C/ml eingestellt und 45 Minuten bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend 10 Minuten zentrifugiert (560 x g) und noch 3 x in RPMI-1 gewaschen. Die Zellen des Spenders A dienten als Stimulator-Zellen. Die Zellen des Spenders B blieben unbehandelt und hatten die Funktion von Responder-Zellen. Die Zellzahlen wurden bestimmt und die Zellen der Spender A und B im Verhältnis 1:1 in einer Endkonzentration von 1×10^6/ml in RPMI-2 + 10 % inaktiviertes AB-Serum zusammengeführt. In Kulturflaschen wurden die Zellkulturen 7 Tage bei 37 °C, 5 % CO_2 inkubiert.

2.7.

Vermehrung aktivierter T-Lymphocyten durch Zugabe von 20 % Interleukin 2- in regelmäßigen Abständen

Zur Vermehrung von aktivierten T-Lymphocyten wurden Leukocyten unter sterilen Bedingungen isoliert (2.6.) und aktiviert (2.6.1. oder 2.6.2.). Die Zellen wurden nach der Aktivierung 1 x gewaschen (200 x g, 10 Minuten) und eine Zellzahl von 5×10^5/ml unter Zugabe von 20 % Interleukin 2-Medium in RPMI-2 + 10 % aktiviertem AB-Serum eingestellt. Die Zellkulturen wurden anschließend in Kulturflaschen aufgeteilt und 3 Tage bei 37 °C, 5 % CO_2 inkubiert. In Miktrotiterplatten wurde stets ein Parallelansatz durchgeführt zur Messung der ^{3}H-Thymidineinbaurate.

2.8.

Messung der Lymphocytenaktivität durch Einbau von radioaktiv markiertem ^{3}H-Thymidin in die DNA der Zellen oder durch Einbau von radioaktiv markiertem ^{3}H-Uridintriphosphat (^{3}H-UTP) in die RNA

Bei der Messung der Lymphocytenaktivität wurde in Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung eines Versuches ^{3}H-Thymidin (AMERSHAM-BUCHLER) oder ^{3}H-UTP (AMERSHAM-BUCHLER) verwandt.
Die Versuche wurden in Mikrotiterplatten (COSTAR) durchgeführt. In jedem Kulturansatz (200 µl) wurde 1 µCi gespritzt (HAMILTON-SPRITZE) und eine Inkubationszeit von 4,5 Stunden bei 37 ^{o}C, 5 % CO_2 eingehalten. Mit einem automatischen Zellernter (FLOW) wurden die Versuchsansätze auf Filtermatten aufgebracht. Dazu wurde je eine Reihe einer Mikrotiterplatte 10 Sekunden mit Aqua dest., 20 Sekunden mit 10 % TCA + 1 % Pyrophosphat und 20 Sekunden mit 96%igem Alkohol gespült. Die Filtermatten wurden getrocknet und die ausgestanzten Felder in Scintillationsgefäße überführt. 3 ml Scintillationsflüssigkeit Aqualuma (J.T. BAKER) wurden hinzupipettiert. Die Einbaurate der Nukleotide in die Zellen wurde im Scintillationszähler in counts per minute (cpm) gemessen.

2.9.

Isolierung der DNA-abhängigen Polymerasen, Interleukin 2-abhängiger, aktivierter T-Lymphocyten

Zur Isolierung der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen aus aktivierten T-Lymphocyten wurde eine Gesamtzellzahl von mindestens $1x10^{8}$ Zellen benötigt.

2.9.1.

Isolierung der Lymphocytenkerne

Die Aufarbeitung der Zellen wurde in Anlehnung an die von COOKE und KAY (1973) sowie AUSTOKER und Mitarbeitern (1974) beschriebene Methode durchgeführt. Die T-Lymphocyten einer Zellkultur wurden 10 Minuten (200 x g)

zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 1 ml Reticulo-Standard-Puffer (RSB) resuspendiert und für 5 Minuten in einem Eisbad gehalten. Anschließend wurde durch Zugabe von 0,5 ml MKS 1-Puffer Isotonie hergestellt. Die Zellen wurden zuvor in einen Homogenisator (Potter) überführt und 25 Mal "gepottert". Mit 1 ml MKS-2 Puffer wurde die Suspension aufgenommen. Die Kerne wurden durch Zentrifugation sedimentiert (10 Minuten, 560 x g) und die Kernzahl ermittelt. Der Überstand wurde als Cytoplasmafraktion in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei - 25 °C gelagert. Die Zellkerne wurden in 5 ml TES-Puffer resuspendiert und ebenfalls tiefgefroren.

2.9.2.
Aufarbeitung der Kerne und der Cytoplasmafraktion

Nach raschem Auftauen der Zellkerne in TES-Puffer wurden diese 1 Stunde bei 4 °C bei 13 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Kernplasmafraktion, das in TGED-Puffer + 20 mM Ammoniumsulfat + 5 mM $MgCl_2$ ($TGED^+$-Puffer) resuspendierte Sediment als DNA-Fraktion bezeichnet. Zum Ablösen der noch an die DNA gebundenen RNA-Polymerasen wurde die DNA-Fraktion 9 x 5 Sekunden mit einem Ultraschallgerät (BRANSON-MODELL B 12) beschallt. Anschließend wurden alle drei Zellfraktionen (Cytoplasma-, Kernplasma- und DNA-Fraktion) 45 Minuten bei 100 000 x g zentrifugiert (MSA-Superspeed 65, Ultrazentrifuge). Das Volumen der Überstände wurde mit $TGED^+$-Puffer auf 2,5 ml aufgefüllt. Die Sedimente wurden verworfen.
Die Zellfraktionen wurden zum Entsalzen auf gewaschene PD 10 Säulen (PHARMACIA) mit einer Gelbetthöhe von 7 cm und einem Durchmesser von 1,5 cm gegeben und mit 3 ml $TGED^+$-Puffer nachgewaschen. Die austretenden Durchläufe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 25 °C gelagert. Eine Proteinbestimmung nach ESEN (2.3.5.) wurde vor und nach dem Entsalzen durchgeführt. Alle Arbeitsgänge wurden bei 0 - 4 °C durchgeführt.

2.10.

Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sephadex A 25 und Gradienten Elution

Zur Auftrennung der RNA-Polymerasen in den Zellfraktionen wurde DEAE-Sephadex A 25 Gel in TGED + 1 M Ammoniumsulfat vorgequollen. Säulen (Gelbetthöhe 20 cm, Ø 0,5 cm) wurden mit dem Gel gepackt und mit $TGED^+$-Puffer eluiert. Der Probenauftrag auf eine Säule betrug 2,5 ml. Nachdem die Säule beladen war, wurde sie erneut mit $TGED^+$-Puffer gewaschen. Die Eluierung der Probe erfolgte durch einen Ammoniumsulfat Gradienten von 20 mM bis 0,6 M in $TGED^+$-Puffer (je 25 ml im Gradientenmischer). Die Fraktionsgröße betrug 0,75 ml. Pro Fraktion wurden 50 µl 70 mM Mercaptoäthanol vorgelegt. Der Säulendurchlauf wurde photometrisch bei 280 nm verfolgt.
Die Fraktionen wurden im Enzymtest (2.11.) auf RNA-Polymeraseaktivität getestet.
Der Verlust der RNA-Polymeraseaktivität der Zellfraktionen durch Chromatographie wurde ermittelt. Der ^{3}H-UTP-Einbau einer Zellfraktion vor der Chromatographie und die Aktivität des Waschеluats wurden im Enzymtest gemesen. Die Aktivität des Waschеluats wurde in % der Gesamtaktivität angegeben.

2.11.

Enzymtest

Es wurde der Enzymtest modifiziert nach KESSLER-ROSSBACH (1982) durchgeführt. Die Vorbereitungen fanden im Eisbad statt. Je 50 µl einer Fraktion wurden in Mikrotiterplatten vorgelegt. 75 µl eines Stammansatzes und 25 µl Template (Poly d(AT).d(AT)) (SIGMA) wurden hinzupipettiert. Jeder Ansatz wurde mit je 1 µCi ^{3}H-UTP markiert und die Mikrotiterplatten anschließend 2 Minuten vorsichtig geschüttelt.
Nach 1-stündiger Inkubation bei 37 ^{o}C, 5 % CO_2, im Wasserbad wurde die Reaktion in jedem Ansatz durch Zugabe von 50 µl eiskalter 10%iger TCA + 1 % Pyrophosphat gestoppt. Die Ansätze wurden mit dem Zellernter

geerntet und die ^{3}H-UTP-Einbaurate in cpm im Scintillationszähler gemesen.

Der Stammansatz für diesen Enzymtest setzte sich wie folgt zusammen:

In 100 ml TRIS-HCL (50 mM, pH 8,0) waren gelöst in der Endkonzentration für einen Ansatz (≙ 150 µl):

60 mM Ammoniumsulfat
1,5 mM $MnCl_2$
5 mM $MgCl_2$
10 mM Dithiothreitol (DTT)
0,4 mM Adenosintriphosphat (ATP)
0,4 mM Cytidintriphosphat (CTP)
0,4 mM Guanosintriphosphat (GTP)
0,02 mM Uridintriphosphat (UTP)

+ 50 ml Glycerin

Die Enzymaktivität der RNA-Polymerasen in Enzymeinheiten konnte nur von den Fraktionen CF, KF und DF vor der Austauschchromatographie errechnet werden. Eine Enzymeinheit wurde als die Proteinmenge (µg) definiert, die in 60 Minuten bei 37 ^{o}C 1 pMol ^{3}H-UTP in ein säurefällbares Polynukleotid (RNA) einbaut. 1 pMol entsprechen dabei 124 cpm.

2.12.

Identifizierung der T-Lymphocyten Subpopulation mit FITC-konjugierten monoklonalen Antikörpern

Zur Charakterisierung der Lymphocytensubpopulationen in einer Langzeitkultur wurden FITC-konjugierte (Fluoroisothiocyanat) monoklonale Antikörper verwendet. Es handelte sich um OKT-3 (T-Lymphocyten), OKT-4 (T-Helfer-Zellen) und OKT-8 (T-Suppressor-Zellen) monoklonale Antikörper der Firma ORTHO oder um Leu 3 (T-Suppressor-Zellen) und Leu 7 (T-Helfer-Zellen) der Firma BECTON-DICKINSON.

Die zu bestimmenden Zellen wurden aus einer Kulturflasche entnommen und in RPMI-1 2 x 10 Minuten gewaschen (200 x g). Eine Zellzahl von $1x10^7$/ml wurde eingestellt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei 2 °C durchgeführt. Die Methodik wurde nach Vorversuchen, abweichend von den Anleitungen der Hersteller standardisiert.
100 µl der Zellen wurden in Glasröhrchen überführt und eine Menge monoklonaler Antikörper hinzupipettiert, die je nach Hersteller und Alter zwischen 10 und 50 µl schwankte.
Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten in der Dunkelheit und wurde durch zweimaliges leichtes Aufschütteln der Ansätze unterbrochen. Nach Zugabe von 2 ml RPMI-1 wurden die Zellen zentrifugiert (10 Minuten, 200 x g) und das Sediment in 20 µl RPMI-1 aufgenommen. Je 10 µl wurden auf einen fettfreien Objektträger gebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Objektträger wurden im Eisbett in der Dunkelheit bis zur Auswertung maximal 2 Stunden gelagert. Die fluoreszierenden Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop (ZEISS) ausgezählt.

2.13.
Autoradiographie-Darstellung des Einbaus von ^{3}H-Thymidin und ^{3}H-UTP in aktivierte, Interleukin 2-abhängige T-Lymphocyten

Aktivierte T-Lymphocyten einer Zellkultur wurden auf eine Zellzahl von $5x10^5$/ml eingestellt. 200 µl der Zellkultur wurden in Mikrotiterplatten vorgelegt. α-Amanitin in Endkonzentrationen von 200 µg/ml und 1 µg/ml wurde hinzupipettiert. Kontrollen erhielten anstelle von α-Amanitin die entsprechende Menge RPMI-1. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde (37 °C, 5 % CO_2) wurden die Ansätze mit je 1 µCi ^{3}H-UTP markiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2,5 Stunden (37 °C, 5 % CO_2) wurden die Zellen mittels Cytocentrifuge (SHANDON-ELLIOTT, Modell SCA 0030) auf beschichtete Objektträger (0,5%ige Gelatine + 0,05 % Chromalaun in H_2O) aufgebracht. Die Auftragsdauer betrug 4,5 Minuten bei 310 Upm. Die Objektträger wurden anschließend luftgetrocknet.

Kontrollen wurden mit ^{3}H-Thymidin markiert und nach einer Inkubationszeit von 4,5 Stunden nach der beschriebenen Methode aufgetragen.
Zur Fixierung der aufgetragenen Zellen wurden folgende Lösungen benötigt, die jedes Mal frisch angesetzt und auf - 15 °C abgekühlt werden mußten.
Lösung A : 2-Methylbutan
Lösung B : 2-Methylbutan, Äthanol, 96%ig, Aceton, im Verhältnis 18:1:1
Lösung C : Äthanol, 96%ig, Aceton, im Verhältnis 2:1.
Die Objektträger wurden nacheinander 30 Sekunden in Lösung A, 30 Sekunden in Lösung B und 5 Minuten in Lösung C eingetaucht. Anschließend wurden sie luftgetrocknet.
Um überschüssiges ^{3}H-UTP bzw. ^{3}H-Thymidin von der Auftragsstelle zu entfernen, mußten die Objektträger gewaschen werden. Die dazu benötigten Lösungen waren:
10%ige TCA + 1 % Pyrophosphat, 10%ige TCA und 96%iges Äthanol.
Die Objektträger wurden bei 2 °C, 5 Minuten in 10%ige TCA + 1 % Pyrophosphat, 2 x 5 Minuten in 10%ige TCA und 2 x 5 Minuten in 96%igen Äthanol getaucht, luftgetrocknet und bei - 15 °C gelagert.
Nach dem Waschen der Zellen wurden die Objektträger nochmals zur besseren Haftung des Films in eine 5%ige Gelatinelösung ohne Chromalaun getaucht. Die Auftragung des Films auf die Objektträger sowie alle weiteren Vorgänge bis zur Fixierung der Objektträger wurden in einer Dunkelkammer durchgeführt.
Der verwendete Film lag in Gelform vor. Es handelte sich um die "Ilford Photographic Emulsion G 5". Nach Anleitung des Herstellers wurde das Filmmaterial mit Aqua dest. bei 40 °C angelöst. Durch Eintauchen der Objektträger in den angelösten Film wurden sie beschichtet und aufrecht stehend getrocknet. Die beschichteten Objektträger wurden 5 Tage exponiert.
Die Entwicklung der Objektträger erfolgte mit unverdünntem KODAK D 19 Entwickler. Die Entwicklungszeit betrug 2 Minuten bei 18 °C. Nach kurzem Zwischenwässern wurden die Objektträger in ein Fixierbad getaucht (UNIFEX, KODAK) und 5 - 7 Minuten bei 18 °C belassen. Anschließend wurden die Objektträger 10 Minuten gewässert und getrocknet.
Die Färbung der Zellen erfolgte durch eine Toluidin-Blau Färbung.

Lösungen: 1%ige Toluidin Blau-Lösung in Aqua dest.
1,8%ige NaCl-Lösung.

Beide Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und 10 Minuten (560 x g) zentrifugiert. Die Färbezeit betrug 50 Minuten.
Bei der Auswertung wurden pro Objektträger 300 Zellen ausgezählt.
Die "grains" pro Zelle wurden folgender Einteilung zugeordnet:
0 - 50, 51 - 100, 101 - 200, $\triangleq$ 200 "grains" pro Zelle.
Grains sind die durch Radioaktivität im Filmmaterial erzeugten schwarzen Punkte.

2.14.
Vitalitätstest

Die Lymphocyten wurden auf ihre Vitalität in Trypanblaulösung getestet. Dazu wurde im Verhältnis 1:1 eine 20%ige Trypanblaulösung - in physiologischer Kochsalzlösung - mit der Lymphocytenlösung vermischt.
Nach 1 Minute wurden die toten Zellen in einer Neubauer Kammer ausgezählt. Tote Zellen nahmen den Farbstoff auf und erschienen blaugefärbt.
Die Auswertung des Tests erfolgte in - % tote Zellen.

$$\% \text{ tote Zellen} = \frac{\text{Anzahl blaugefärbter Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl der Zellen}} \times 100$$

2.15.
Interferontest nach der CPE-Reading Methode

Der CPE- (Cytophatischer Effekt)-Reading Assay wurde im Mikrotitersystem auf Mikrotiterplatten durchgeführt (V. RHEINBABEN, 1980).
Die zu testenden Proben wurden im Doppelansatz mit 2 % - EAGLE-Medium (FLOW) in eine Verdünnungsreihe von 1:2 bis 1:64 gebracht.
Zu 50 µl der verdünnten Proben wurden 50 µl einer frisch trypsinierten U-Zellsuspension (2×10^5 Zellen/ml) pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden im CO_2-Brutschrank bei 37 °C 12 Stunden inkubiert.

Jeweils [illegible] wurden mit 25 µl EMC-Virus (Encephalo-Myocarditis Virus) 10^4 ID_{50} infiziert. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37 °C, 5 % CO_2, bis zur Auswertung.
Als Kontrollen wurden neben einer Zell- und Viruskontrolle auch eine [illegible] mitgeführt. Der Interferonstandard der Firma BEHRING, Marburg, wurde auf 1:50 in 2 %-EAGLE-Medium vorverdünnt und dann in [illegible] 1:2 bis 1:64 in Mikrotitrationen 10^{-1} als Standardwert zur Beurteilung des Interferontests mit den Proben herangezogen.
Bei der Auswertung im Umkehrmikroskop (ZEISS) wurde der Einfluß der Proben auf die [illegible] Zellen durch die CPE-Reading Methode beurteilt. Durch Anwesenheit von Interferon in den Proben wurden die Zellen durch das EMC-Virus nicht geschädigt. Als Kontrolle diente die Zellkontrolle ohne Virus. Der Interferontiter einer Probe wurde definiert als der reziproke Wert der höchsten Verdünnung, die mindestens 50 % des CPE zeigt (Interferonstandard).

3. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden im allgemeinen graphisch im Text dargestellt. Die zugehörigen Tabellen (Tab. 8 - 22) finden sich im tabellarischen Anhang (3.11.).

3.1.
Interleukin 2 (IL 2) Herstellung, modifiziert nach NOVOGRODSKY et al. (1980)

Interleukin 2 (IL 2) wird von aktivierten Lymphocyten gebildet. Die Aktivierung von Leukocyten durch eine Reihe von polyklonalen T-Zell-Stimulantien, wie die Pflanzenlektine Concanavalin A (Con A) oder Phytohämagglutinin (PHA), führt zur IL 2 Produktion (SOLBACH et al., 1983).

Eine weitere Möglichkeit der IL 2 Produktion ist die 30-minütige Inkubation von Leukocyten mit Neuraminidase (NA) und Galactoseoxidase (GO). Diese oxidierenden Mitogene aktivieren Lymphocyten, indem sie ihre Zelloberflächenproteine durch Einführung von Aldehydgruppen verändern. Die Aktivierung bedingt die Ausschüttung eines Wachstumsfaktors (IL 2). Dieser ist wiederum in der Lage, aktivierte periphere Blutlymphocyten zur Teilung anzuregen und auch die Differenzierung von "Mixed Lymphocyte Culture"(MLC)-Gedächtniszellen zu sekundären Cytotoxischen T-Lymphocyten (CTL) zu induzieren (NOVOGRODSKY et al., 1980).
Zur IL 2-Herstellung wurden Leukocyten aus humanem, peripheren Blut isoliert und mit Neuraminidase-Galactoseoxidase (NAGO) 30 Minuten inkubiert und anschließend gewaschen, um überschüssige Oxidantien zu entfernen.
Die Leukocyten wurden in Kultur gebracht und 48 Stunden inkubiert.
Die Überstände dieser Kulturen wurden gesammelt und Proben zum Nachweis von IL 2 und Interferon entnommen.
Die Kulturüberstände wurden vereinigt, durch einen Ultrafilter auf ein Viertel des Volumens eingeengt und durch eine Fällung mit 80 % Ammoniumsulfat weiter konzentriert. Nach einer Dialyse wurde das IL 2 durch Gelfiltration (AcA 54-Gel) weiter gereinigt.
Die einzelnen Fraktionen wurden auf IL 2 und Interferon mit den entsprechenden Nachweismethoden (2.4. und 2.15.) geprüft, da Interferon im gleichen Molekulargewichtsbereich wie IL 2 liegt und bei der Aktivierung

von T-Lymphocyten gebildet wird. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, 2.3.6. durchgeführt.

Im IL 2-Nachweistest wurde Interleukin sowohl in allen Kulturüberständen nachgewiesen als auch im Filtrat, Dialysat und Fraktionspool 82 - 96. Bei dem IL 2-Nachweistest macht man sich die IL 2-Abhängigkeit aktivierter T-Lymphocyten zunutze. Das Prinzip des IL 2-Nachweises beruht also auf seiner Eigenschaft, in vitro ein klonales Wachstum und eine funktionelle Differenzierung jener T-Zellen zu bewirken, die Rezeptoren für IL 2 besitzen (RUSCETTI et al., 1977; GILLIS et al., 1978).
Den einfachsten IL 2-Nachweis stellt der Lymphocyten-Proliferationstest dar; Langzeit-T-Zellinien, deren Wachstum vollständig von IL 2 abhängig ist, proliferieren in einer klaren Dosis-Wirkung-Abhängigkeit nach IL 2-Zugabe.
Humane Lymphocyten wurden mit PHA aktiviert und weitere 11 Tage mit IL 2 kultiviert (2.6.1.). In einer Verdünnungsreihe von 50 - 2,5 % wurden die zu testenden IL 2-haltigen Proben den Lymphocyten zugeführt und weitere drei Tage bis zur Markierung mit ^{3}H-Thymidin inkubiert. Der Einbau von radioaktiv markiertem ^{3}H-Thymidin in die DNA der Lymphocyten war ein Maß für die Teilungsaktivität der Lymphocyten und damit ein Hinweis auf die Wirkung von IL 2 (Abb. 3, Tab. 8).

Die IL 2-Konzentration in den 6 getesteten Kulturüberständen war deutlich geringer als die des Filtrats aus diesen Überständen. Die IL 2-Konzentration in dem Dialysat und dem Pool aus den Fraktionen 82 - 96 war deutlich höher. Bei einer Zugabe von 50 % dieser IL 2-haltigen Proben steigt der ^{3}H-Thymidineinbau von 860 $\pm$ 513 cpm (K), über 6 140 $\pm$ 630 cpm (F) auf 44 510 $\pm$ 2 005 cpm (D), also um das 52-fache an. Der ^{3}H-Thymidineinbau überstieg bei dem Fraktionspool (P) den Wert des Dialysats (D) nicht. Mit sinkender Konzentration der zu testenden Überstände wurde auch der ^{3}H-Thymidineinbau geringer. Bei 2,5%iger Zugabe des Dialysats und Fraktionspools lag der ^{3}H-Thymidineinbau jedoch immer noch höher als der Einbau bei Zugabe von 20 % der Kulturüberstände (K). Zu beachten ist jedoch, daß der ^{3}H-Thymidineinbau bei einer Konzentration mit 50 % der Kulturüberstände (K) niedriger war als der bei 20%iger Zugabe, was auf eine Hemmwirkung bei höherer IL 2-Dosis hinweist.

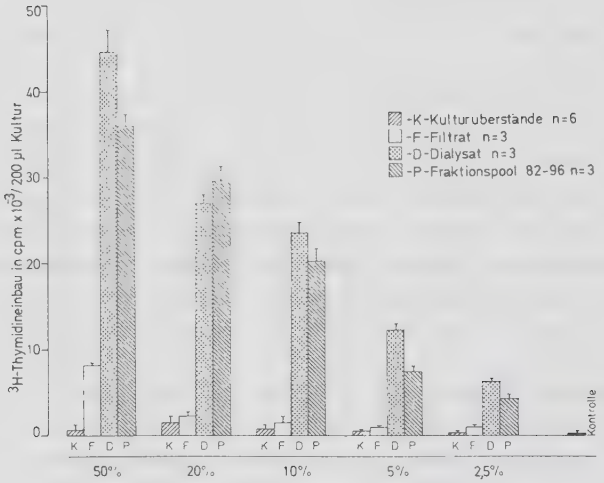


Abb. 3: Interleukin 2 (IL 2)-Nachweistest in 6 Kulturüberständen verschiedener Spender (K), des Filtrats (F) und Dialysats (D) dieser Kulturüberstände sowie der gepoolten Fraktionen 82-96 (P) im Dreifachansatz, n=3.
Die Werte geben den ^{3}H-Thymidineinbau in cpm an.
Die Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur betrug 1x10^5.
Inkubation: 3 Tage, 37 °C, 5 % CO_2.

Die hemmende Wirkung von hohen Dosen IL 2 aus ungereinigten Überständen wurde auch von RUSCETTI und GALLO (1981) beschrieben.
Die Mediumkontrollen K waren bei allen Tests positiv. Die ^{3}H-Thymidineinbaurate der T-Lymphocyten ohne IL 2-haltige Proben war erwartungsgemäß gering und überstieg 429 ± 53 cpm nicht.
Zur weiteren Reinigung des IL 2 wurde das Dialysat durch Gelfiltration in einer ACA 54 Säule aufgetrennt.

Zur Bestimmung des Leervolumens V_o der Säule diente 0,1 g Blue Dextran in 2 ml HEPES-NaCl-Puffer.
Die Säule wurde mit folgenden Proteinen bekannten Molekulargewichts geeicht. Die Proteinkonzentration betrug 2 mg/ml. Es wurden 2 ml aufgetragen:

Rinderserumalbumin (BSA)	MG	= 67 000
Ovalbumin	MG	= 45 000
Trypsinogen	MG	= 24 000
Cytochrom C	MG	= 12 300

Es wurden 25 ml des Dialysats aufgetragen. Die Proteinkonzentration betrug 27 mg/ml.
Die Durchflußgeschwindigkeit war auf etwa 10 ml/Stunde eingestellt.
Die Absorption des Säulendurchlaufs wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt.
Eine Proteinbestimmung der Fraktionen wurde, wie auch alle anderen Proteinbestimmungen, nach der Methode von ESEN (2.3.5.) durchgeführt.
IL 2 wurde im IL 2-Nachweistest nachgewiesen (2⁄4.).
In Abbildung 4 (Tab. 9) sind die Ergebnisse des IL 2-Nachweistests dargestellt. Ein deutlicher Aktivitätsanstieg ist nach der 82. Fraktion zu sehen. Der Aktivitätspeak erstreckt sich über 16 Fraktionen, was in diesem Fall einem Molekulargewichtsbereich von 15 000 bis 20 000 entspricht.
Das IL 2 in den Interleukin 2-haltigen Fraktionen konnte auch bei einer Verdünnung von 2,5 % nachgewiesen werden. In den Kontrollen, die kein IL 2 enthielten, ist ein ^{3}H-Thymidineinbau kaum nachweisbar.
Es ist bekannt, daß bei der Aktivierung von Mäuse T-Lymphocyten durch Mitogene neben Interleukin 2 auch γ-Interferon (γ-IFN) gebildet wird (JOHNSON und TORRES, 1982; KLEIN et al., 1982; HANDA et al., 1983).
Es war für uns von Interesse, ob sich bei der hier beschriebenen Gewinnung von IL 2 auch Interferon nachweisen ließ.
Der Interferon-Test wurde im Mikrotest-System nach der CPE (Cytopathischer Effekt) Reading-Methode mit U-Zellen und EMC-Virus (Encaphalomyocarditis-Virus) durchgeführt (2.15.). Die Ergebnisse sind auf den Interferon-Standard der BEHRING-Werke, Marburg, bezogen.

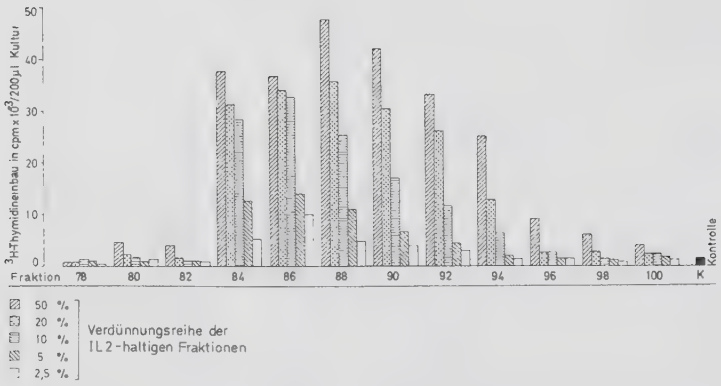


Abb. 4: Interleukin 2 (IL 2)-Nachweis in den Fraktionen 78-100. nach AcA 54-Chromatographie.
Von jeder zu testenden Fraktion wurde eine Verdünnung von 50, 20, 10, 5 und 2,5 % gewählt.
Eine Kontrolle erhielt IL 2-freies Medium. Die Werte geben die ^{3}H-Thymidineinbaurate in cpm an.
Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur = $1x10^5$
Inkubation: 3 Tage, 37 °C, 5 % CO_2.

Alle auf IL 2 getesteten Proben wurden auf ihren Interferon Gehalt untersucht. In den Kulturüberständen, dem Filtrat und dem Dialysat betrug der IFN Titer $\geq$ 64. Ein genauerer Titer kann nicht angegeben werden, da die Verdünnungsreihe in allen Versuchen nur bis 1 : 64 durchgeführt werden konnte. In den Fraktionen der Gelfiltration wurde ebenfalls Interferon nachgewiesen.
Aus Abbildung 5 (Tab. 9) ist zu ersehen, daß das Interferon in den Fraktionen 82 - 88 gleichzeitig mit dem IL 2 eluiert.
Interferon hat ein Molekulargewicht von 20 000 - 30 000.
Es ist nur geringfügig größer als IL 2 mit einem Molekulargewicht von 15 000 (GILLIS et al., 1982; SOLBACH et al., 1983), wodurch es zu keiner

vollständigen Trennung der beiden Lymphokine kommt. Das IL 2 verläßt die Säule nach dem Hauptproteinpeak und ist bis zur 130. Fraktion noch nachweisbar.

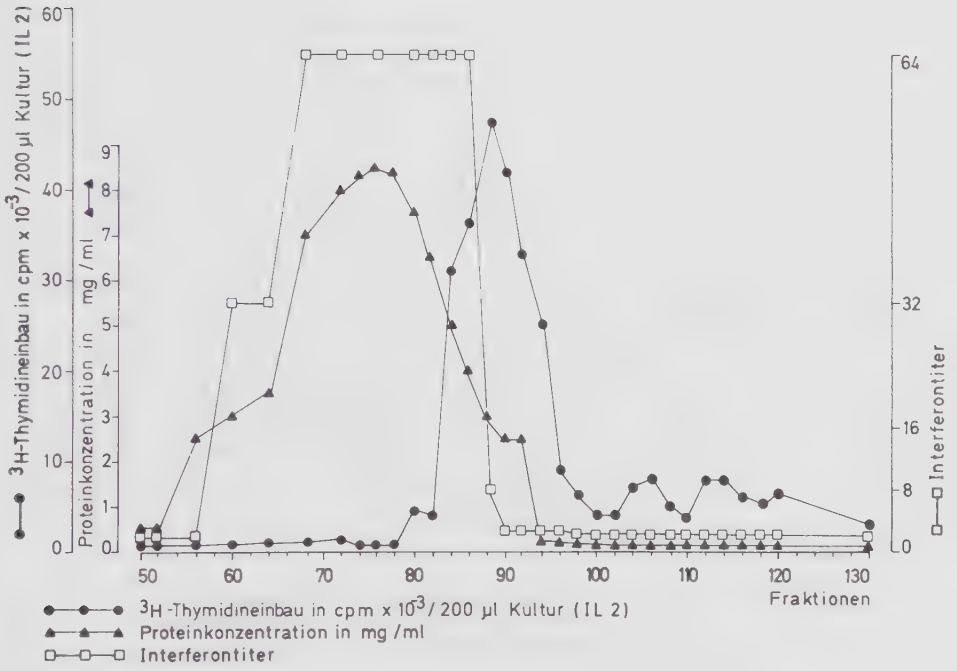


Abb. 5: Ergebnisse der Gelfiltration zur Interleukin 2 (IL 2) Herstellung aus konzentrierten Kulturüberständen Neuraminidase-Galactoseoxidase-aktivierter Leukocyten. Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur = $1x10^5$ Inkubation: 3 Tage, 37 °C, 5 % CO_2, Der Interferon-Titer wurde durch die CPE-Reading-Methode ermittelt (2.15.).

Zum Nachweis von IL 2 und Interferon im Dialysat und in den Fraktionen 82 - 96 wurde die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (Abb. 6).

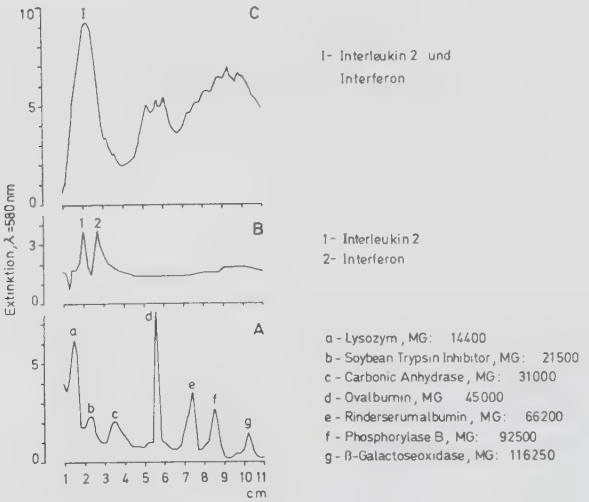


Abb. 6: SDS-Polyacrylamid-Gele eines Standards (A), der gepoolten Fraktionen 82 - 96 (B) und des Dialysats (C) durch Gelscanning bei 580 nm, 30 cm/Stunde.

Das Dialysat zeigt mehrere Proteinbanden. Besonders ausgeprägt ist die erste sich darstellende Bande (I), die das IL 2 und Interferon umfaßt. Entscheidend ist jedoch die Darstellung der Probe aus den gepoolten Fraktionen 82 - 96 (B). Durch die SDS-PAGE wurden die Proteine IL 2 (1) und Interferon (2) klar voneinander getrennt.
Das Interferon 2 liegt verglichen mit dem Standard im Molekulargewichtsbereich von 17 500 bis 18 000.

Die Interferonbande liegt im Molekulargewichtsbereich von 24 000 - 25 000.
Weitere Proteinbanden ließen sich auf diesem Gel nicht nachweisen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die zur Interleukin 2 Herstellung modifizierte Methode nach NOVOGRODSKY und Mitarbeitern (1980) eine ausreichende Stimulierung der T-Helfer-Zellen zur Interleukin 2-Produktion erbrachte. Durch die verschiedenen Reinigungsschritte war es möglich, ein weitgehend reines IL 2 herzustellen.

3.2.
Austestung der Interleukin 2 (IL 2)-Konzentration zur Erhaltung von IL 2-abhängigen T-Lymphocyten in Langzeitkulturen

Interleukin 2 (IL 2) hat die Eigenschaft, aktivierte T-Lymphocyten zur Bildung von Effektorzellen anzuregen und die ausdifferenzierten Effektorzellen über längere Zeiträume im exponentiellen Wachstum zu halten. Die proliferierenden Zellen behalten dabei ihre spezifischen cytotoxischen Eigenschaften (RUSCETTI et al., 1977; GILLIS et al., 1978).
Zu diesem Zweck testeten wir zunächst unser (nach der Neuraminidase-Galactoseoxidase-Methode hergestelltes) IL 2 im Vergleich zu käuflich erworbenem IL 2-LT der Firma BIOTEST.
T-Lymphocyten wurden durch 7-tägige Inkubation in einer Lymphocyten-Mischkultur (MLC) aktiviert. Eine Reihenverdünnung von 50, 20, 10, 5 und 2,5 % der zu testenden IL 2-Proben wurde vorgelegt und die aktivierten T-Lymphocyten in einer Endkonzentration von $5x10^5$/ml hinzugefügt.
Die Inkubationszeit betrug 3 Tage. Die Teilungsaktivität der T-Lymphocyten wurde durch die ^{3}H-Thymidineinbaurate in die DNA ermittelt (Tab. 1).

		^{3}H-Thymidineinbau (cpm) / 200 µl Kultur				
Konzentration (%)		50	20	10	5	2,5
IL 2-Dialysat aus Kulturüberständen, n=3	$\bar{x}$	44 510	28 726	24 684	12 313	6 132
	s	2 005	1 065	1 268	798	159
IL 2-Fraktionspool, nach Gelfiltration*, n=3	$\bar{x}$	35 991	29 437	20 029	7 524	4 296
	s	1 311	1 533	1 784	835	514
IL 2-LT von BIOTEST	$\bar{x}$	40 591	24 432	12 943	5 740	2 781
	s	2 539	1 740	701	539	297

Tab. 1: Wirksamkeit verschiedener Interleukin 2 (IL 2)-haltiger Proben auf die Teilungsaktivität IL 2-abhängiger T-Lymphocyten.

Mediumkontrolle ohne IL 2: $\bar{x}$ = 263, s = 40, n = 6
Die Werte geben den ^{3}H-Thymidineinbau in cpm an.
Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur = 1×10^5
Inkubation: 3 Tage, 37 °C, 5 % CO_2.

Die Aktivität des IL 2-LT ist vergleichbar mit der Aktivität des Dialysats und Fraktionspools. Mit 36 000 bis 45 000 cpm ^{3}H-Thymidineinbaurate in die DNA der IL 2-abhängigen T-Lymphocyten bei einer Konzentration der Proben von 50 %, ist die Teilungsrate dieser Zellen sehr hoch. Bei einer Konzentration von 20 % im Kulturansatz ist die ^{3}H-Thymidineinbaurate mit 24 432 $\pm$ 1 740 cpm (IL 2-LT), 28 726 $\pm$ 1 065 cpm (IL 2-Dialysat) und 29 437 $\pm$ 1 533 cpm (Fraktionspool) ebenfalls noch relativ hoch. In ihrer Wirksamkeit sind diese drei IL 2-haltigen Proben durchaus gleichwertig.

Zur Erhaltung von aktivierten T-Lymphocyten in Langzeitkulturen war es notwendig, die dazu erforderliche IL 2-Medium-Konzentration * zu ermitteln.

* s. Definition des Laborstandards, 2.5.

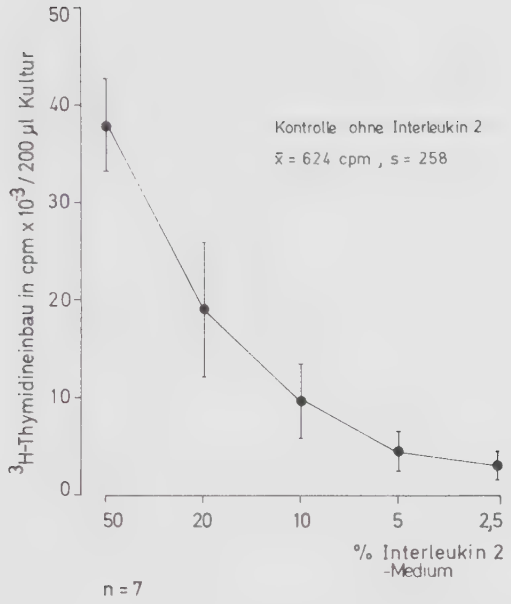


Abb. 7: Bestimmung der IL 2-Medium-Konzentration * zur Erhaltung von aktivierten T-Lymphocyten in Langzeitkulturen.
Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur = $1x10^5$
Inkubation: 3 Tage, 37 °C, 5 % CO_2.

Die T-Lymphocyten wurden durch eine 7-tägige Inkubationszeit in einer Lymphocyten-Mischkultur aktiviert. IL 2-Medium in den Verdünnungen von 50, 20, 10, 5 und 2,5 % pro Kulturansatz wurde vorgelegt und die aktivierten Zellen in einer Konzentration von $5x10^5$/ml hinzugefügt.

* s. Definition des Laborstandards, 2.5.

Die Inkubationszeit betrug 3 Tage. Die ^{3}H-Thymidineinbaurate in die DNA, als Maß für die Teilungsaktivität der aktivierten T-Lymphocyten, wurde anschließend gemessen (Abb. 7, Tab. 10).

Die Konzentration von 50 % IL 2-Medium bewirkt nach 3-tägiger Inkubationszeit die höchste Thymidineinbaurate bei den Zellen (37 844 cpm). Die Werte mit 20 % IL 2-Medium liegen um ca. 45 % niedriger - im Mittel um 19 200 cpm. Die Schwankungsbreite liegt mit $\pm$ 7 000 cpm jedoch höher als bei 50%iger IL 2-Medium-Zugabe (hier $\pm$ 5 000 cpm). Für die Fragestellung der weiteren Versuche wählten wir eine IL 2-Medium-Konzentration von 20 %.

Zusätzlich wurden die aktivierten T-Lymphocyten in 2 weiteren Lymphocyten-Mischkulturen ohne IL 2-Zugaben bzw.nach Ausbleiben einer IL 2-Zugabe gemessen.
Dazu wurde in einem ersten Versuch 20 % IL 2-Medium im Abstand von 3 Tagen zur Kultur gegeben.
Im zweiten Versuch erfolgte nur eine einmalige Zugabe von 20 % des IL 2-Mediums, während im dritten Ansatz keine Zugabe von IL 2 erfolgte (Abb. 8, Tab. 11).

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die Teilungsaktivität der T-Lymphocyten mit dem Ausbleiben der IL 2-Zugaben sinkt. Das Fehlen von IL2 in einer Kultur mit IL 2-abhängigen T-Lymphocyten macht sich stärker bemerkbar, wenn die Teilungsaktivität vorher besonders ausgeprägt ist (Kultur 2, B). Die Ergebnisse zeigen aber auch, daß eine IL 2-Zugabe im Abstand von 3 Tagen ausreichend ist; in Kombination mit der Erneuerung des Nährmediums und der Einstellung der Zellzahl auf $5x10^{5}$/ml.

Aus den dargelegten Ergebnissen ist somit abzuleiten, daß die Aktivierung der T-Lymphocyten mit Interleukin 2-haltigem Medium eindeutig konzentrationsabhängig ist. Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, daß eine 20%ige Konzentration des IL 2-Mediums *, das auch

* s. Definition des Laborstandards, 2.5.

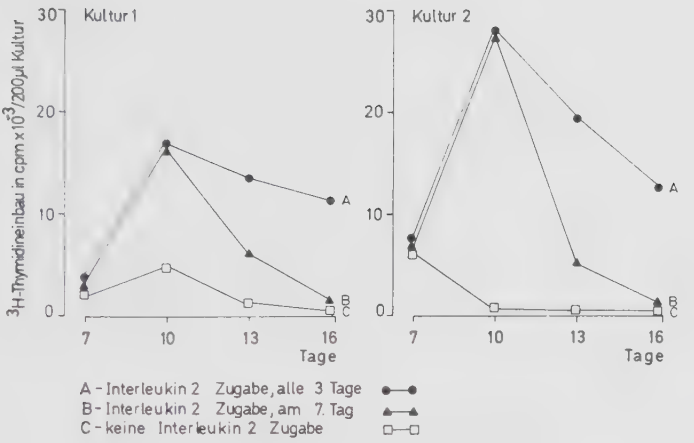


Abb. 8: ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA IL 2-abhängiger T-Lymphocyten nach IL 2-Zugaben zu verschiedenen Zeiten. Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur = $1x10^5$ Inkubation: 37 °C, 5 % CO_2.

als unser Laborstandard dient, zur Erhaltung und Proliferation aktivierter T-Lymphocyten ausreichend ist.

3.3.

Mixed lymphocyte culture (MLC)

Voraussetzung für eine Kultivierung IL 2-abhängiger T-Lymphocyten ist ihre Aktivierung (FARRAR, 1980; SMITH et al., 1980). Die Aktivierung der T-Zellen kann sowohl durch Mitogene (MORGAN et al., 1976; GILLIS und SMITH, 1977) als auch durch Lymphocyten-Mischkulturen (MLC) erfolgen (RYSER et al., 1978).

Durch Ko-Kultivierung von Lymphocyten zweier Individuen können Unterschiede bezüglich der Transplantationsantigene ohne vorherige Sensibilisierung erfaßt werden. Besteht zwischen diesen beiden Individuen Inkompatibilität bezüglich der Transplantationsantigene (HLA-DR), so werden die

T-Zellen aktiviert. Die Interaktion von HLA-DR-Molekülen auf den Lymphocyten des einen Individuums mit den korrespondierenden Rezeptoren auf den Lymphocyten des anderen Individuums resultiert in der Expression von Rezeptoren für IL 2. Sind die T-Zellen durch den Rezeptor für IL 2 erst einmal IL 2-abhängig geworden, besteht keine weitere Fordernis für HLA-DR Antigene. Die fortlaufende Proliferation und das Wachstum IL 2-reaktiver Zellen ist dann abhängig von der Verfügbarkeit von IL 2.
Für die Identifizierung des Antigenmusters eines bestimmten Individuums ist Voraussetzung, daß sich in der MLC nur eine der beiden Lymphocytenpopulationen transformiert. Durch Vorbehandlung einer Kultur mit Mitomycin C wird erreicht, daß diese Zellen nicht mehr stimuliert werden können, aber die für sie charakteristische Oberflächenstruktur nicht beeinträchtigt wird.
Zur Charakterisierung des zeitlichen Ablaufs der Aktivierung von T-Lymphocyten in einer MLC wurden humane, periphere Lymphocyten isoliert (2.6.). Die Zellen des einen Spenders (1) wurden als Stimulator-Zellen mit Mitomycin C vorbehandelt. Die Zellen des anderen Spenders (2) dienten als Responder-Zellen. Im Verhältnis 1:1 wurden Responder- und Stimulator-Zellen zusammengeführt und kokultiviert.
Als Kontrollen dienten die Responder- und Stimulator-Zellen in getrennten Kulturflaschen. Täglich wurde die ^{3}H-Thymidineinbaurate in die DNA gemessen und die Lebendzellzahl bestimmt.
Es wurde hier ein Doppelversuch durchgeführt, wobei die Responder-Zellen von 2 verschiedenen Spendern stammten, die Stimulator-Zellen jedoch in beiden Versuchen identisch waren (Abb. 9, Tab. 12, 13).
Die beiden oberen Zeichnungen in Abb. 7 zeigen die Aktivierung von T-Lymphocyten in einer MLC (MLC 1 und MLC 2) (A) durch den Einbau von ^{3}H-Thymidin/200 µl Kultur und die beiden Kontrollversuche (B und C), in denen die Responder-Zellen (B) und die Stimulator-Zellen (C) getrennt kultiviert wurden.
Die beiden unteren Zeichnungen zeigen den prozentualen Anteil der absterbenden Zellen an der Gesamtzellzahl, ermittelt durch den Vitalitätstest. Es wird deutlich gezeigt, daß die ^{3}H-Thymidineinbaurate in die DNA und damit die Teilungsaktivität der Responder-Zellen in beiden MLC, MLC 1 und MLC 2, steigend ist. Die Responder-Zellen des MLC 1 unterscheiden sich jedoch von denen des MLC 2 durch eine deutlich niedrigere Einbaurate

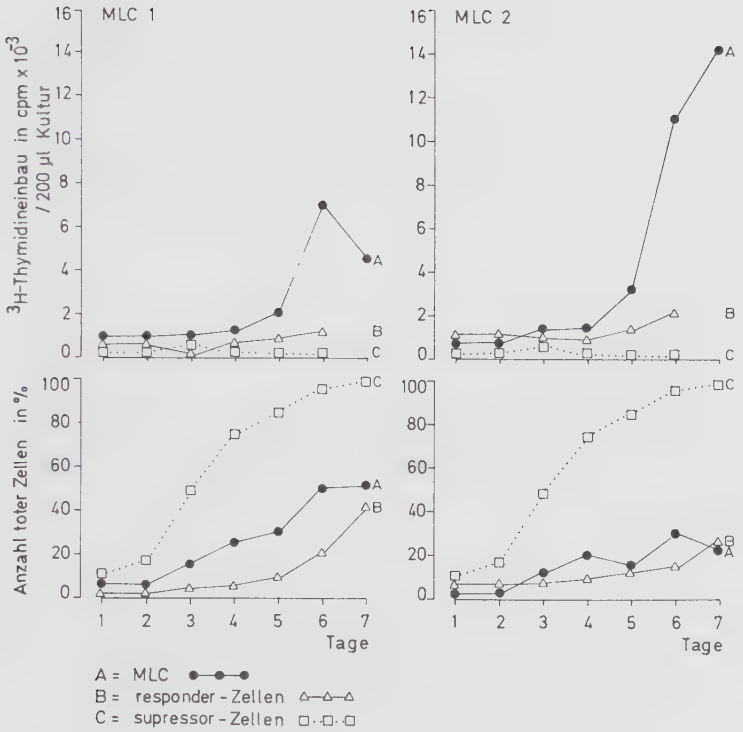


Abb. 9: Aktivierung von T Lymphocyten in einer MLC (MLC 1 und MLC 2) und die Veränderung der Lebendzellzahl. Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur (A) = $2x10^5$ (B und C) = $1x10^5$
Inkubation: 37 °C, 5 % CO_2.

am 6. und 7. Tag. Die ^{3}H-Thymidineinbaurate der unbehandelten Responder-Zellen zeigt keine auffallend steigende Tendenz, wohingegen die mit Mitomycin C behandelten Stimulator-Zellen auf Grund ihrer eingeschränkten DNA-Replikation einen sinkenden ^{3}H-Thymidineinbau zeigen. Diese Erscheinung wird auch in der Sterberate der Stimulator-Zellen deutlich, die am 7. Tag 99 % erreicht hat. Die Anzahl der toten Zellen in MLC 1 erreicht 52 %, die in MLC 2 nur 23 %. Aufallend ist die ebenfalls geringe Sterberate der Responder-Zellen (MLC 2) mit nur 26 %. Die Responder-Zellen (MLC 1) sind am 7. Tag zu 42 % irreversibel geschädigt. Diese Zellen vermögen offensichtlich in reinem Kulturmedium einen bestimmten Zeitraum zu überleben.

3.4.

Wachstumsverhalten MLC-aktivierter T-Lymphocyten in Langzeitkultur

Anknüpfend an Versuch 3.3. wurden 3 verschiedene Lymphocyten-Mischkulturen (MLC) zur Aktivierung von T-Lymphocyten angezüchtet (2.6.2.) Am 7. Tag wurden die Zellen jedes MLC gewaschen und in frischem Nährmedium (RPMI-2; 1 % inaktiviertes AB-Serum) unter Zugabe von 20 % Interleukin 2 (IL 2)-Medium resuspendiert. Eine Zellzahl von $5x10^{5}$/ml wurde eingestellt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurde die Zellzahl der Kulturen erneut bestimmt, der ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA gemessen und das Nährmedium - soweit möglich - in den Kulturflaschen unter Zugabe von 20 % IL 2-Medium erneuert.
Dieser Vorgang wurde alle 3 Tage wiederholt. Auf diese Weise wurden die Zellen in einer Langzeitkultur über einen Zeitraum von 52 Tagen beobachtet. Am 52. Tag wurde der Versuch beendet (Abb. 10 - 12, Tab. 14).

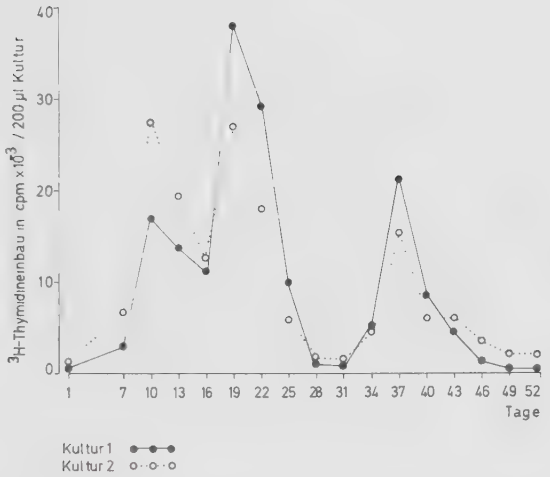


Abb. 10: ^{3}H-Thymidineinbau (cpm) aktivierter Interleukin 2 (IL 2)-abhängiger T-Lymphocyten.
Zugabe von 20 % IL 2-Medium im Abstand von 3 Tagen.
Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur nach dem 7. Tag und alle weiteren 3 Tage = 1x10^5
Inkubation nach dem 7. Tag: je 3 Tage, 37 ^{o}C, 5 %

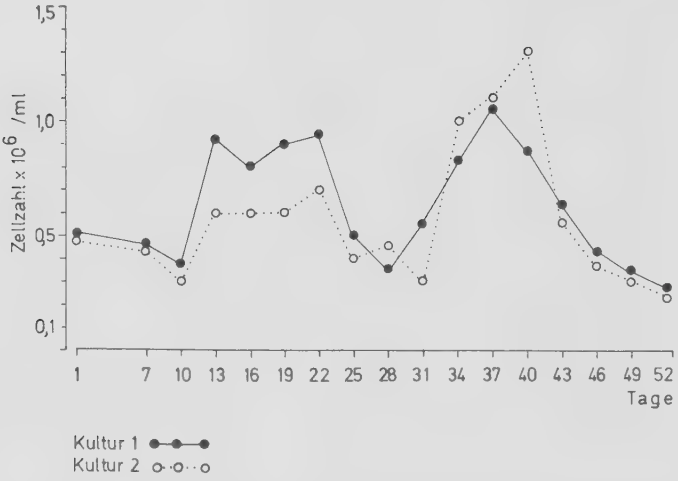


Abb. 11: Zelldichte aktivierter Interleukin 2 (IL 2)-abhängiger T-Lymphocyten.
Zugabe von 20 % IL 2-Medium im Abstand von 3 Tagen.
Inkubationszeit nach dem 7. Tag: je 3 Tage, 37 °C, 5 % CO_2.

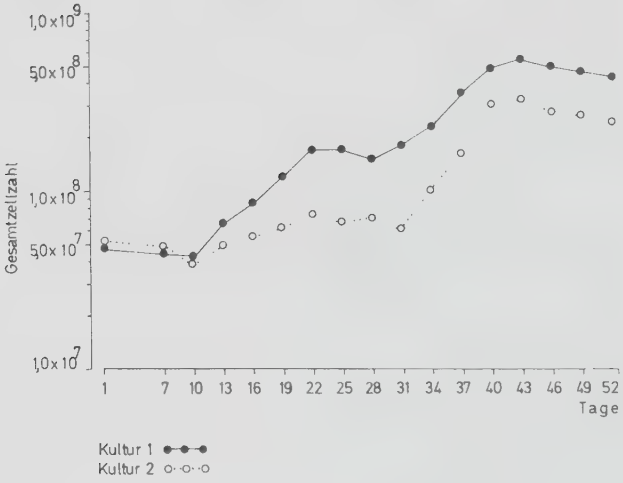


Abb. 12: Gesamtzellzahl aktivierter Interleukin 2 (IL 2)-abhängiger T-Lymphocyten.
Zugabe von 20 % IL 2-Medium im Abstand von 3 Tagen.
Inkubationszeit nach dem 7. Tag: je 3 Tage, 37 °C, 5 % CO_2.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Wachstumsverlauf beider Kulturen parallel verläuft. Die Aktivierung der T-Lymphocyten erfolgt zunächst bis zum 10. Tag. Der erste Tiefpunkt ist am 16. Tag erreicht (Abb. 10).
Es folgt ein zweiter Aktivitätsanstieg mit höheren ^{3}H-Thymidineinbauraten an den Tagen 16 bis 22.
Zwischen dem 25. und 34. Tag sinkt die Aktivität der Zellen auf ein Minimum, was auf eine Ruhephase der T-Lymphocyten hinweist. Es folgt zwischen dem 34. und 37. ein letzter Aktivitätsanstieg.
Die Werte des ^{3}H-Thymidineinbaus sinken vom 40. Tag kontinuierlich ab. Die Zellen treten zu diesem Zeitpunkt in die sogenannte "crisis phase" ein, wie auch von GRIMM und ROSENBERG (1982) beschrieben wurde.
Vergleicht man parallel dazu die Zelldichten der Kulturen (s. Abb. 11), die jeden 3. Tag vor der fälligen IL 2-Zugabe ermittelt wurden, sieht man einen ähnlichen Verlauf. Die IL 2-abhängigen T-Lymphocyten wachsen an und erreichen mehrere Tage, bis zum 22. Tag, fast immer die gleiche Zellkonzentration. Zwischen dem 24. und 31. Tag sinkt die Zelldichte vorübergehend und steigt erst am 34. Tag erneut an. Es werden Zellzahlen zwischen $1x10^{6}$/ml und $1,3x10^{6}$/ml erreicht.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse des ^{3}H-Thymidineinbaus in die DNA, mit der Gesamtzellzahl der Kulturen (s. Abb. 12) zeigt sich, daß einem gemessenen erhöhten ^{3}H-Thymidineinbau, der ein Maß für die DNA-Replikation ist, erwartungsgemäß stets eine Vermehrung der Gesamtzellzahl folgt.
Die Gesamtzellzahl beider Kulturen erhöht sich in den 52 Tagen - ausgehend von 100 ml - von $5x10^{7}$ auf $4,3x10^{8}$ (Kultur 1) bzw. auf $2,4x10^{8}$ (Kultur 2). Die Zellzahl hat sich in diesem Zeitraum fast verneunfacht (Kultur 1), bzw. verfünffacht (Kultur 2).
In den hier beschriebenen Versuchen sollten durch eine MLC aktivierte IL 2-abhängige T-Lymphocyten in großen Mengen angezüchtet werden. Zusätzlich sollten sie Aufschluß über ihr Wachstumsverhalten in Langzeitkultur geben.
Für die noch auszuführenden Versuche erwies sich die Aktivierung der IL 2-abhängigen T-Lymphocyten jedoch als ungeeignet, da die notwendigen Gesamtzellzahlen zu verschiedenen - weiter auseinander liegenden Zeitpunkten - erreicht werden.

3.5.

Aktivierung von Interleukin 2 (IL 2)-abhängigen T-Lymphocyten

T-Lymphocyten werden zum einen für Interleukin 2 (IL 2) empfindlich durch die Wechselwirkung mit HLA-DR-Antigenen auf Antigen-präsentierten Zellen und zum anderen direkt mit Mitogenen, wie den Pflanzenlektinen Phytohaemagglutinin (PHA) oder Concanavalin A (Con A).
Con A und PHA aktivieren T-Lymphocyten durch den gleichen Mechanismus. Obwohl sie an verschiedene Strukturen auf T-Zellen binden, scheint es, daß diese Lektine die T-Zellen durch denselben Rezeptor anregen.
Es werden dabei IL 2 produzierende Zellen - nach dem Kontakt mit dem das Lektin präsentierenden akzessorischen Zellen - zur IL-Synthese angeregt und Vorläufer T-Zellen - nach Kontakt mit dem Lektin und IL 2- zur Bildung von IL 2-reaktiven T-Zellen angeregt. Diese IL 2-reaktiven T-Zellen bilden nach Kontakt mit IL 2 die Effektor-T-Zellen (PALACIOS, 1982) (Abb. 1).
Es sollte nun im Anschluß an die vorausgegangenen Versuche festgestellt werden, ob die Lymphocyten durch PHA besser aktiviert werden als durch eine Lymphocyten-Mischkultur (MLC).

Nach Vorversuchen hatten wir herausgefunden, daß eine Aktivierung frisch isolierter Leukocyten durch die Zugabe von 20 % IL 2-Medium plus 1 % PHA in den Kulturansatz verbessert wurde.
Es wurden mehrere Versuchsansätze zur Aktivierung von Lymphocyten vorbereitet. Die Aktivierung durch 1 % PHA plus 20 % IL 2-Medium und die Aktivierung in einer MLC wurden durch den ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA nach 5 Tagen gemessen und verglichen (Abb. 13; Tab. 15).
Die Ergebnisse zeigen zunächst, daß sowohl die Aktivierung durch PHA + IL 2 als auch die Aktivierung durch eine MLC erfolgreich war.

Die Aktivierung durch 1 % PHA + 20 % IL 2 erwies sich als effektiver als die Aktivierung von T-Lymphocyten in einer MLC. Die ^{3}H-Thymidineinbaurate nach 5-tägiger Inkubationszeit lag bei 35 368 $\pm$ 8 085 cpm und damit um das 2,5-fache höher als 13 892 $\pm$ 7 564 cpm, die durch eine MLC erreicht wurden.

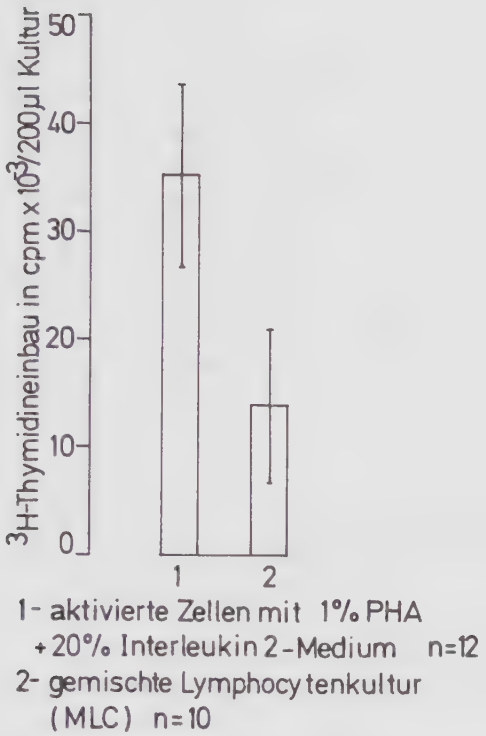


Abb. 13: ^{3}H-Thymidineinbau in T-Lymphocyten, aktiviert durch 1 % PHA plus 20 % IL 2-Medium oder eine MLC. Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur = $2x10^5$ Inkubation: 5 Tage, 37 °C, 5 % CO_2.

Die Aktivierung von T-Lymphocyten in einer MLC geschieht nur, wenn die Transplantationsantigene der beteiligten Zellen verschieden sind. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, das HLA-DR der Spender-Zellen zu typisieren. Die Aktivierung von T-Lymphocyten durch 1% PHA plus 20 % IL 2-Medium erwies sich als zuverlässiger. Bei den weiteren Versuchen wurde daher zur Aktivierung der T-Lymphocyten nach dieser Methode vorgegangen.

Bei integrierender Betrachtung der Ergebnisse der Aktivierung IL 2-abhängiger T-Lymphocyten, sowie des Wachstumsverhaltens MLC-aktivierter T-Lymphocyten ist festzuhalten, daß die Aktivierung der T-Lymphocyten in der "Mixed Lymphocyte Culture" (MLC) und die weitere Expandierung dieser Zellen mit Interleukin 2 über einen Zeitraum von 52 Tagen möglich war. Durch die verschiedenen Wachstumszyklen während dieses Zeitraums war es jedoch nicht möglich, eine ausreichend große Zellzahl zu erhalten, um unsere weiteren Versuche zur Bestimmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen fortzusetzen. Die Vergleichsuntersuchungen zur Aktivierung der Lymphocyten mit Phytohaemagglutinin (PHA) erbrachten eine höhere Stimulierung und Teilungsrate.

3.6.
PHA-Abhängigkeit aktivierter T-Lymphocyten in Langzeitkultur nach Vorstimulierung mit 1 % PHA und 20 % Interleukin 2 (IL 2 -Medium)

Für unsere Versuche war es wichtig, daß es sich bei den Zellen in Langzeitkultur um ausschließlich Interleukin 2 (IL 2)-abhängige T-Lymphocyten handelte. Solange in den Langzeitkulturen ein größerer Anteil der Gesamtpopulation auf Mitogene empfindlich reagiert, können Ergebnisse mit Mitogen-haltigen Überständen verfälscht sein (GRIMM und ROSENBERG, 1982). Es war daher für uns von Interesse, zu welchem Zeitpunkt die mit 1 % PHA + 20 % IL 2-Medium aktivierten T-Lymphocyten einer Langzeitkultur PHA-unabhängig sind, d. h. durch die Anwesenheit von PHA nicht beeinflußbar sind.
Dazu wurden humane, periphere Leukocyten isoliert und 5 Tage mit 1 % PHA + 20 % IL 2-Medium inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und in frischem Nährmedium resuspendiert.
In Mikrotiterplatten wurde PHA in Endkonzentrationen von 1,0 bis 0,1 % vorgelegt.
Nach 3 Tagen wurde der ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA der Zellen gemessen. Die Versuche wurden zweimal wiederholt.
Kontrollen ohne PHA und ohne IL 2 sowie Kontrollen mit 20 % IL 2-Medium wurden mitgeführt (Abb. 14; Tab. 16).

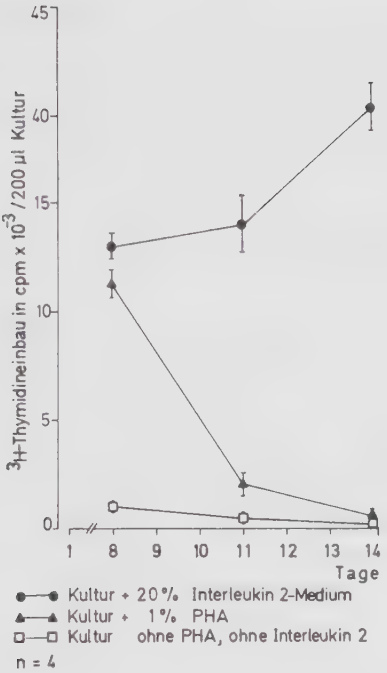


Abb. 14: ^{3}H-Thymidineinbau aktivierter, PHA-abhängiger T-Lymphocyten.
Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur = $1x10^5$
Inkubation: 37°C, 5 % CO_2.

Die PHA-Abhängigkeit von aktivierten T-Lymphocyten ist nach 8 Tagen noch gegeben. Die ^{3}H-Thymidineinbaurate der mit IL 2 exponierten Kontrolle ist dem ^{3}H-Thymidineinbau der mit 1 % PHA inkubierten Kultur vergleichbar. Es wurde beobachtet, daß die Zellen in Langzeitkultur nach 11 Tagen weitgehend PHA-unabhängig waren und nach 14 Tagen durch die Anwesenheit von PHA in der Kultur nicht weiter beeinflußt werden. Die eintretende PHA-Unabhängigkeit von aktivierten T-Lymphocyten nach 14 Tagen wurde auch von GRIMM und ROSENBERG (1982) beschrieben.

Die Zellen, die im Medium ohne IL 2 und ohne PHA belassen wurden, zeigen einen geringen ^{3}H-Thymidineinbau.
Sowohl für Versuche mit IL 2-abhängigen T-Lymphocyten als auch für IL 2 Nachweistests war der Zeitpunkt der alleinigen IL 2-Abhängigkeit aktivierter T-Lymphocyten von Bedeutung.

3.7.
Wachstum von PHA-aktivierten T-Lymphocyten in Langzeitkultur

Im folgenden Versuch sollten Interleukin 2 (IL 2)-abhängige T-Lymphocyten in größeren Mengen angezüchtet werden und das Verhalten der RNA-Polymerasen und die DNA-Aktivität in vitro charakterisiert werden. Periphere, humane Leukocyten wurden isoliert (2.6.) und die Zellzahl auf $1x10^{6}$/ml eingestellt. Zur Aktivierung der T-Lymphocyten wurde den Zellen 1 % PHA und 20 % IL 2-Medium zugeführt. Die Kulturen wurden 5 Tage exponiert und anschließend gewaschen. Eine Zellzahl von 5×10^{5}/ml wurde unter Zugabe von 20 % IL 2-Medium eingestellt. Dieser Vorgang wurde im 3-Tages-Rhythmus wiederholt.

Da die aktivierten T-Lymphocyten durch den Einfluß von IL 2 stark wachsen und sich teilen, resultiert eine hohe Proteinsynthese. Diese ist wiederum von der RNA-Synthese abhängig. Die RNA-Synthese wird durch die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen katalysiert. α-Amanitin, das Gift des grünen Knollenblätterpilzes (Amanita phalloides) hemmt spezifisch eukaryontische RNA-Polymerasen (SEIFART und SEKERIS, 1969). RNA-Polymerase II wird schon durch geringe Mengen (1 µg/ml-Spezies-abhängig) gehemmt, während RNA-Polymerase III auf einen Konzentrationsbereich von 200 µg/ml anspricht (Angaben nach ROEDER, 1976).
Zur Charakterisierung der RNA-Polymerasen wurde täglich ein α-Amanitin-Test durchgeführt.
Dazu wurden Zellen aus den laufenden Kulturen entnommen und auf eine Zellzahl von $4x10^{5}$/ml eingestellt. Nach 1-stündiger Inkubationszeit mit α-Amanitin wurden die Versuchsansätze mit ^{3}H-Uridintriphosphat (^{3}H-UTP) markiert und bis zur Zellernte 4,5 Stunden exponiert. Bei der Transkription der DNA durch die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen wird anstelle des Thymidinmonophosphats Uridinmonophosphat in die RNA eingebaut. Durch die Zugabe von ^{3}H-UTP wird also nur die Aktivität der RNA-Polymerasen gemessen.

Zur Bestimmung der Zellteilung wurde täglich auch der ^{3}H-Thymidin-einbau in die DNA zur selben Zeit gemessen.
In Tabelle 17 und Abbildung 15 sind der ^{3}H-UTP Einbau der Lymphocyten während des ∝-Amanitin-Versuchs an 8 Kulturen in einem Zeitraum von 15 Tagen dargestellt. Bei den Ergebnissen ist zu berücksichtigen, daß es sich bei den Zellen zu Beginn der Zellkultur um Leukocyten handelt. Durch die PHA-Aktivierung verschiebt sich das Verhältnis der Zellen jedoch zu Gunsten der T-Lymphocyten, die alleine durch IL 2 zur Vermehrung gebracht werden können. Die nicht aktivierten Zellen bleiben nicht lebensfähig.

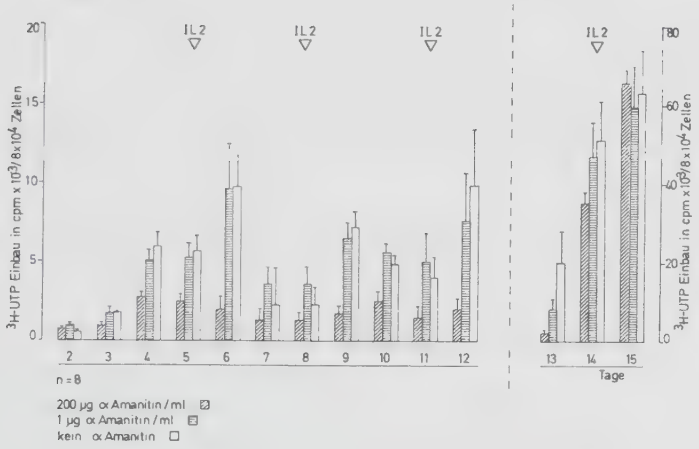


Abb. 15: ^{3}H-UTP-Einbau in PHA-aktivierten T-Lymphocyten bei verschiedenen ∝-Amanitin Konzentrationen. Der Zeitpunkt der IL 2-Zugabe ist durch Pfeile markiert. Die Tage 13-15 auf der Zeichnung haben einen geänderten Maßstab.
Zellzahl: 8×10^{4}
Inkubation: 37 °C, 5 % CO_2.

Die Einbauraten bei 200 µg α-Amanitin/ml sind ein direktes Maß für die Aktivität der RNA-Polymerase I. Bis zum 13. Tag liegt ihre Aktivität nicht höher als 2 600 ± 600 cpm.
Der Verlauf der RNA-Polymerase Aktivität ist, wie auch bei den zu vergleichenden 1 µg α-Amanitin/ml- und Kontrollwerten (kein α-Amanitin, sondern Kulturmedium) cyclisch. Einem Aktivitätsanstieg folgt jeweils eine über 2 Tage anhaltende Aktivitätsminderung bis zum 13. Tag.
Die 1 µg Werte zeigen das gemeinsame Verhalten der RNA-Polymerasen I und III. Die Werte ohne α-Amanitin stellen die Gesamtaktivität aller RNA-Polymerasen dar und sind gleichermaßen eine Kontrolle. Vergleicht man sie mit den Werten 1 µg α-Amanitin/ml, liegen sie wenig oder nicht höher. Eine Hemmung der RNA-Polymerase II durch 1 µg α-Amanitin ist nicht immer erkennbar.
Auffallend sind die extrem hohen ^{3}H-UTP Einbauraten an den letzten beiden Tagen der Zellkultur. Die Werte ohne α-Amanitin steigen auf 62 700 ± 10 877 cpm. Die Werte mit 1 µg α-Amanitin/ml erreichen ca. 60 000 ± 10 427 cpm. Der ^{3}H-UTP-Einbau am 15. Tag mit 200 µg α-Amanitin beträgt 62 797 ± 10 877 cpm. Die Hemmung der RNA-Polymerasen durch α-Amanitin ist nicht deutlich erkennbar. Durch die stark ansteigende RNA-Synthese ist eine hohe Proteinsynthese, besonders in den Tagen 13 bis 15 wahrscheinlich.

Wird die ^{3}H-UTP-Einbaurate in die RNA im α-Amanitin-Versuch in folgendes Schema eingesetzt, so kann die Aktivität der RNA-Polymerasen in % bestimmt werden (Tab. 2.).

	^{3}H-UTP-Einbau (cpm)				
Ansatz	RNA-Polymerasen		I	II	III
ohne α-A.	x	9458			
1 µg α-A. /ml	y	8653		805 x-y	
200 µg α-A./ml	z	3065	3065 z		5588 y-z
errechnetes Aktivitäts-verhältnis in %		9458 = 100 %	32,4	8,5	59,1

Tab. 2: Aufschlüsselung der RNA-Polymerase-Aktivitäten in % nach HAHN (1979)
(Beispiel)

Bei 4 Kulturen war es möglich, die RNA-Polymerase Aktivitäten zu errechnen. Abb. 16 und Tab. 18 zeigen die Werte.

Bis zum 12. Tag ist die Aktivität der RNA-Polymerase III, die in erster Linie die Synthese der t-RNA katalysiert, stark erhöht.
Der Anteil der RNA-Polymerase II - sie katalysiert die Synthese der hn-RNA und m-RNA - ist stets am geringsten ausgeprägt. Am 14. Tag der Zellkultur erfolgt eine Umkehrung der Verhältnisse. Die Aktivität der RNA-Polymerase I (für r-RNA) steigt über 60 %.
Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß durch die Anwesenheit von α-Amanitin/ml ein erhöhter ^{3}H-UTP-Einbau gemessen wird und daß das tatsächliche Verhältnis der RNA-Polymerasen im Zellkern zueinander nicht wiedergegeben wird, was noch zu diskutieren ist. Auffallend ist jedoch, daß am 13. Tag eine deutliche Veränderung in den IL 2-abhängigen T-Lymphocyten bezüglich der RNA-Synthese eintritt.

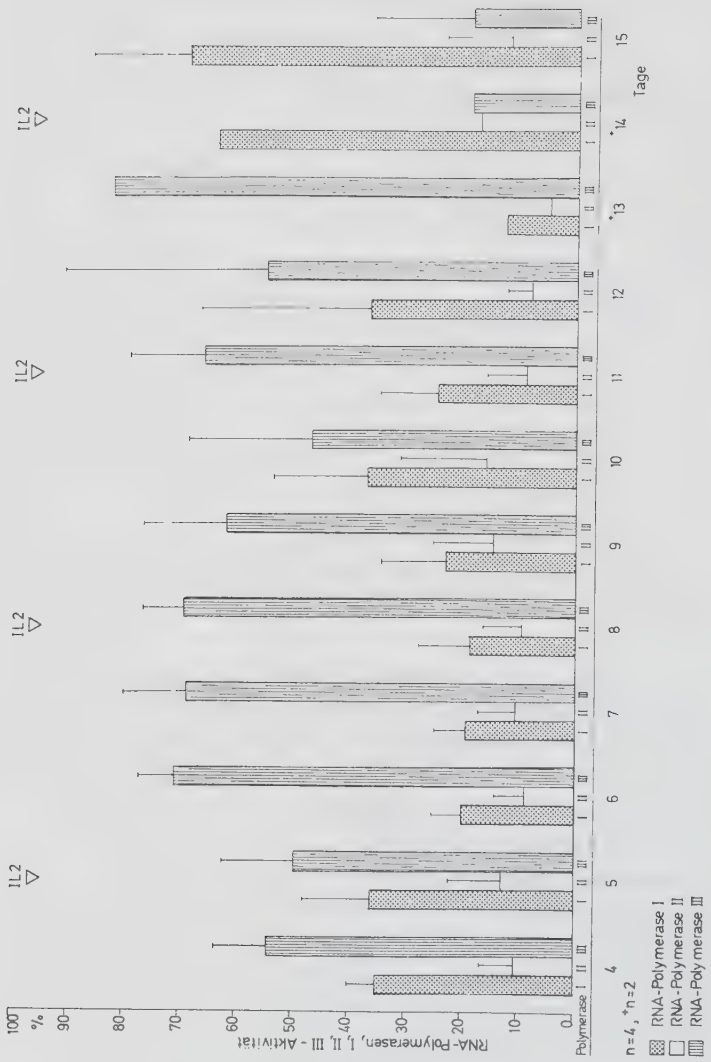


Abb. 16: Aktivität der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen PHA aktivierter Lymphocyten in %.
Die IL 2-Zugaben sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Zusammenfassend läßt sich in diesem Versuch aussagen, daß die RNA-Polymerasen innerhalb von 2 IL 2-Zugaben Aktivitätsunterschiede zeigen. Die Hemmung der RNA-Polymerase II durch 1 µg ∝-Amanitin/ml ist nicht in allen Lymphocyten-Kulturen nachweisbar. Die ^{3}H-UTP-Einbaurate ist an den letzten Tagen der Zellkultur auffallend hoch.
In den 15 Tagen der Zellkultur wurde auch das Wachstumsverhalten und die Teilungsaktivität der T-Lymphocyten beobachtet (Abb. 17, 18; Tab. 19).

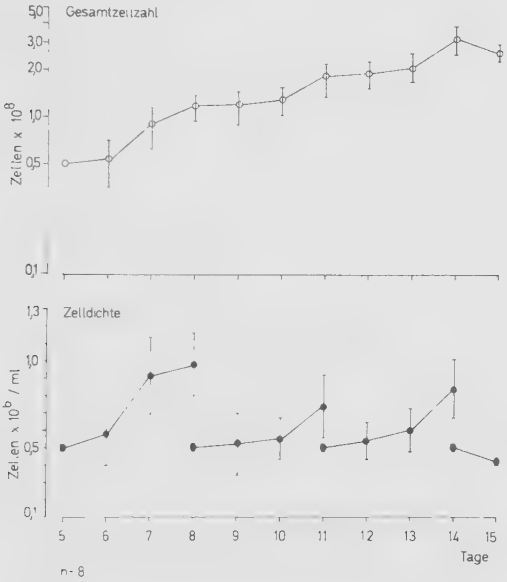


Abb. 17: Wachstum PHA-aktivierter T-Lymphocyten über einen Zeitraum von 15 Tagen.
Inkubation: 37 °C, 5 % CO_2.
Die Gesamtzellzahl (obere Zeichnung) entsteht durch die Summierung aller lebenden Zellen vom Tag 3 bis Tag 15. Die Zelldichte (untere Zeichnung) wurde jeden 3. Tag bei IL 2-Zugabe erneut auf $5x10^5$/ml eingestellt (Tag 5, 8, 11 und 14).

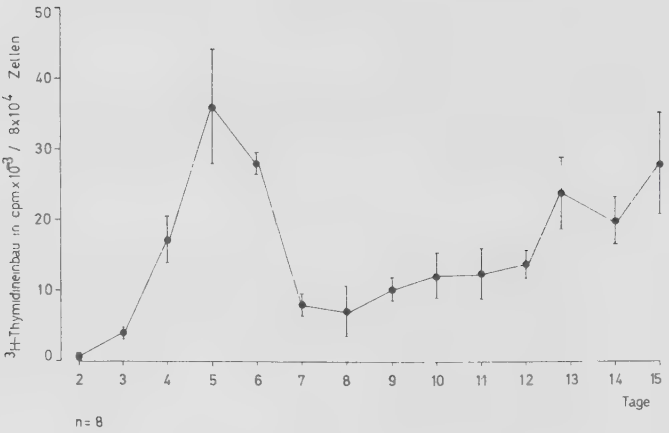


Abb. 18: ^{3}H-Thymidineinbau PHA-aktivierter T-Lymphocyten.
Zellzahl: $8x10^4$
Inkubation: 37 °C, 5 % CO_2.

Nach der 5-tägigen Exponierung mit 1 % PHA und 20 % IL 2-Medium wurden die Lymphocyten im 3-Tages-Rhythmus mit frischem Nährmedium und 20 % IL 2-Medium auf eine Zellzahl von $5x10^5$/ml eingestellt. Täglich wurde mit Parallelansätzen die Zellzahl ermittelt und die ^{3}H-Thymidineinbaurate pro $4x10^5$ Zellen/ml gemessen (Abb. 18).
Die Gesamtzellzahl ($5x10^7$ Zellen), erhöhte sich in 15 Tagen auf ca. $2{,}5x10^8$, also um das 5-fache (s. Abb. 17).

Zwischen dem 5. und 8. Tag verdoppelte sich die Gesamtzellzahl und benötigte dann weitere 4 Tage bis zur nächsten Verdoppelung.
Die mit dem Wachstum eng korrelierte Teilungsaktivität der T-Lymphocyten wurde durch den ^{3}H-Thymidineinbau in $4x10^5$ Zellen/ml gemessen (s. Abb. 18 und Tab. 19). Die Werte zeigen, daß die Teilungsaktvitität

nur in den ersten 5 Tagen während der Inkubation mit 1 % PHA plus 20 % IL 2-Medium ansteigt, in der mittleren Phase zwischen dem 7. und 12. Tag nur geringfügig und erst im letzten Viertel der Zellkultur wieder stärker ansteigt.

Bei abschließender Betrachtung läßt sich feststellen, daß die RNA-Polymerasen in IL 2-abhängigen T-Lymphocyten Aktivitätsunterschiede zeigen. Eine Hemmung der RNA-Polymerase II mit 1 % µg α-Amanitin ist nicht in allen Zellkulturen nachweisbar. Mit dem Anstieg der RNA-Polymerase Aktivität findet auch eine eng korrelierte Teilungsaktivität der T-Lymphocyten statt. Das konnte durch den ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA nachgewiesen werden.

3.8.
Identifizierung der Subpopulationen PHA-aktivierter T-Lymphocyten durch FITC-konjugierte monoklonale Antikörper

In diesem Versuch sollte herausgefunden werden, wie sich die Gesamtpopulation der Zellen im Zeitraum von 15 Tagen in ihrer Zusammensetzung verändert. Mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern können unbekannte Antigene und Antikörper identifiziert werden. Die direkte Methode dient dem Nachweis von Antigenen in Zellen und Geweben. Man läßt fluoreszierende Antikörper in optimaler Konzentration während mindestens 30 Minuten auf die zu bestimmenden Zellen einwirken. Nach Entfernung des nicht gebundenen, überschüssigen Antikörpers wird das Präparat im Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die hier verwendeten monoklonalen Antikörper zur Identifizierung der Zellpopulationen sind mit dem Fluorchrom Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) konjugiert.
Es wurden jeweils die in einem Bildausschnitt liegenden Zellen sowohl im Hellfeld als auch im Dunkelfeld ausgezählt und der prozentuale Anteil der beladenen Lymphocyten zur Gesamtzellzahl ermittelt. Die Veränderung der T-Lymphocyten-Gesamtpopulation wurde in einem Zeitraum von 15 Tagen beobachtet. Jeweils einen Tag nach einer Interleukin 2 (IL 2-Medium)-Zugabe von 20 % wurde der Versuch durchgeführt.

Die OKT-3 monoklonalen Antikörper erfassen alle T-Lymphocyten. OKT-4 monoklonale Antikörper dienen der Identifizierung von T-Helfer-Zellen und OKT-8 monoklonale Antikörper der Identifizierung von T-Suppressor-Zellen/cytotoxischen T-Zellen. Diese beiden Subpopulationen der T-Lymphocyten wurden in diesem Versuch gemeinsam erfaßt (Tab. 20; Abb. 19). Die Kultur enthält, wie die Ergebnisse zeigen, am 1. Tag 46,6 % T-Lymphocyten. Mit andauernder Kultivierungszeit steigt ihr Anteil an der Gesamtzellpopulation zunehmend bis annähernd auf 100 % am 15. Tag.

Die obere Graphik in Abb. 19 zeigt die verschiedenen T-Lymphocyten, die durch die monoklonalen Antikörper identifiziert werden konnten. Die Anzahl der T-Helfer-Zellen (Δ-Δ) im Verhältnis zu der Anzahl der T-Suppressor-Zellen (□-□) ist in der unteren Graphik dargestellt.

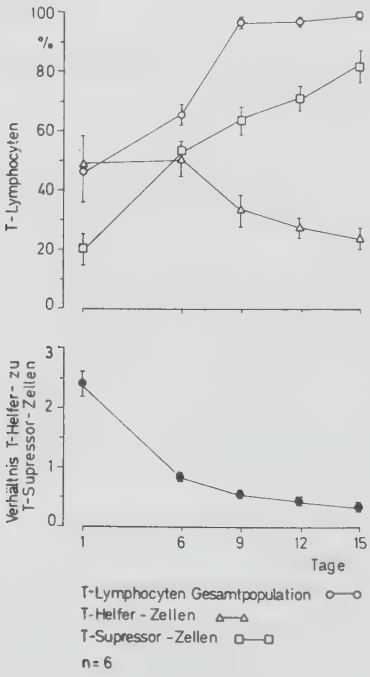


Abb. 19: Anteil der T-Lymphocyten und T-Lymphocyten-Subpopulationen in einer Zellkultur.
Nachweis durch FITC-konjugierte monoklonale Antikörper.

Während der Kultivierungszeit nimmt der Anteil der T-Suppressor-Zellen/CTL zu. Er steigt von anfänglich 20 % auf 77 % am 15. Tag an. Zu diesem Zeitpunkt machen etwa 20 % der T-Lymphocyten die T-Helfer-Zellen aus. Ihr Anteil sinkt um 25 % (von 48 % auf 23 %) innerhalb der 15 Tage Zellkultur.
Das Verhältnis von T-Helfer-Zellen zu T-Suppresor-Zellen /CTL (T_H/T_S) verdeutlicht die Veränderungen der T-Lymphocyten hinsichtlich ihrer Subpopulationen. Es findet eine Umkehrung des Verhältnisses T_H/T_S statt. Am ersten Tag beträgt es 2,5. Es sinkt bis zum 6. Tag, also während der Aktivierungszeit um mehr als die Häflte auf 1,1. Durch die Vermehrung der T-Suppressor-Zellen/CTL verschiebt sich das Verhältnis dann weiter bis auf 0.3.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die zu erwartende Veränderung der T-Lymphocyten-Gesamtpopulation nachgewiesen werden konnte: Zunächst befinden sich Leukocyten in der Zellkultur, neben T-Lymphocyten: Macrophagen, B-Lymphocyten und Granulocyten. Der Anteil der T-Lymphocyten nimmt zu, während die übrigen Zellen allmählich absterben. Das Verhältnis der T-Lymphocyten Subpopulationen verändert sich ebenfalls gegen Ende der Zellkultur von 15 Tagen. Am 15. Tag besteht die Zellkultur zu 98,9 % aus T-Lymphocyten, wovon fast 4/5 T-Suppressor-Zellen/CTL sind.

3.9.
Säulenchromatographische Darstellung DNA-abhängiger RNA-Polymerasen in PHA-aktivierten T-Lymphocyten

Aus den vorangegangenen Versuchsergebnissen ergibt sich die Fragestellung nach dem Aktivitätsverhältnis der RNA-Polymerasen I-III von aktivierten T-Lymphocyten zueinander.
Humanblut wurde, wie in Kapitel 2.6.1. beschrieben, aufgearbeitet und die Leukocyten 5 Tage mit 1 % PHA und Interleukin 2 (IL 2) zur Aktivierung der T-Lymphocyten exponiert. Die Zellen wurden nach 13, 15 und 21 Tagen geerntet und wie beschrieben (2.9.) die RNA-Poylmerasen isoliert.

Bei dem Isoliervorgang wurden drei Zellfraktionen erhalten. Bei den Zellfraktionen handelt es sich um eine Cytoplasmafraktion (CF), Kernplasmafraktion (KF) und DNA-Fraktion (DF), wobei die letztere die DNA gebundenen RNA-Polymerasen enthält. Die Ergebnisse der Proteinbestimmung und die Enzymeinheiten der Zellfraktionen (CF, KF, DF) vor der Gaschromatographie sind in Tabelle 3 a, b wiedergegeben.

Tage Zell-kultur	Kerne ($\times 10^8$)	Proteinkonzentration (mg/ml)			Gesamtproteinauftrag/ Chromatographie (mg)		
		CF	KF	DF	CF	KF	DF
13	1,65	0,5	0,1	0,14	1,25	0,25	0,35
15	1,0	0,52	0,21	0,22	1,3	0,53	0,55
21	0,42	0,1	0,1	0,05	0,25	0,25	0,13

Tab. 3 a: Zellkernausbeute und Proteinkonzentration der verschiedenen Zellfraktionen.

Tage Zell-kultur	pMol ^{3}H-UTP/µg Protein		
	CF	KF	DF
13	0,36	5,12	0,56
15	0,22	0,4	1,32
21	3,87	0,17	0,4

Tab. 3 b: Enzymeinheiten der verschiedenen Zellfraktionen

Die Werte zeigen, daß die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Zellfraktionen sehr unterschiedlich sind (Tab. 3 a) und eine höhere Proteinkonzentration keine vermehrten Enzymeinheiten bedingt (Tab. 3 b).

Die ^{3}H-Thymidineinbaurate in die DNA und der ^{3}H-UTP-Einbau in die RNA, bei verschiedenen Konzentrationen α-Amanitin, wurde an intakten, aktivierten T-Lymphocyten im Parallelversuch gemessen. Die Ergebnisse dieser Parallelversuche sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Tage		13	15	21
^{3}H-Thymidineinbau (cpm/200 µl K.)		32 843	9 865	3 370
^{3}H-UTP-Einbau (cpm/200 µl K.)				
α-Amanitin /µg/ml):	200	1 553	65 255	10 408
	1	11 629	77 861	9 055
	0	12 274	82 393	11 155
RNA-Polymerase-Aktivität (%):	I	12,7	79,2	-
	II	5,2	5,5	-
	III	82,1	17,3	-

Tab. 4: ^{3}H-Thymidineinbau, ^{3}H-UTP-Einbau aktivierter T-Lymphocyten.
Der prozentuale Anteil der einzelnen RNA-Polymerasen errechnet sich nach Tabelle 12 (3.7.).
Ausgangszellzahl (K = Zellkultur) in 200 µl = $1x10^5$
Inkubation: 37 °C, 5 % CO_2.

Nach Chromatographie jeder Zellfraktion an DEAE-Sephadex wurde die RNA-Polymeraseaktivität (^{3}H-UTP-Einbau) in den aufgetrennten Fraktionen bestimmt. Bei der Ionenaustauschchromatographie wird durch Gradientenelution mit 20 mM Ammoniumsulfat/600 mM Ammoniumsulfat in TGED-Puffer die RNA-Polymerase I bei 0,1 M Ammoniumsulfat als erste abgelöst, bei 0,2 - 0,3 M folgt die RNA-Poymerase II und bei $\hat{=}$ 0,3 M wird als letzte die RNA-Polymerase III aus der Säule eluiert (JAEHNING et al., 1975).

Abb. 20-1: Chromatographie der Cytoplasmafraktion aktivierter T-Lymphocyten an DEAE-Sephadex

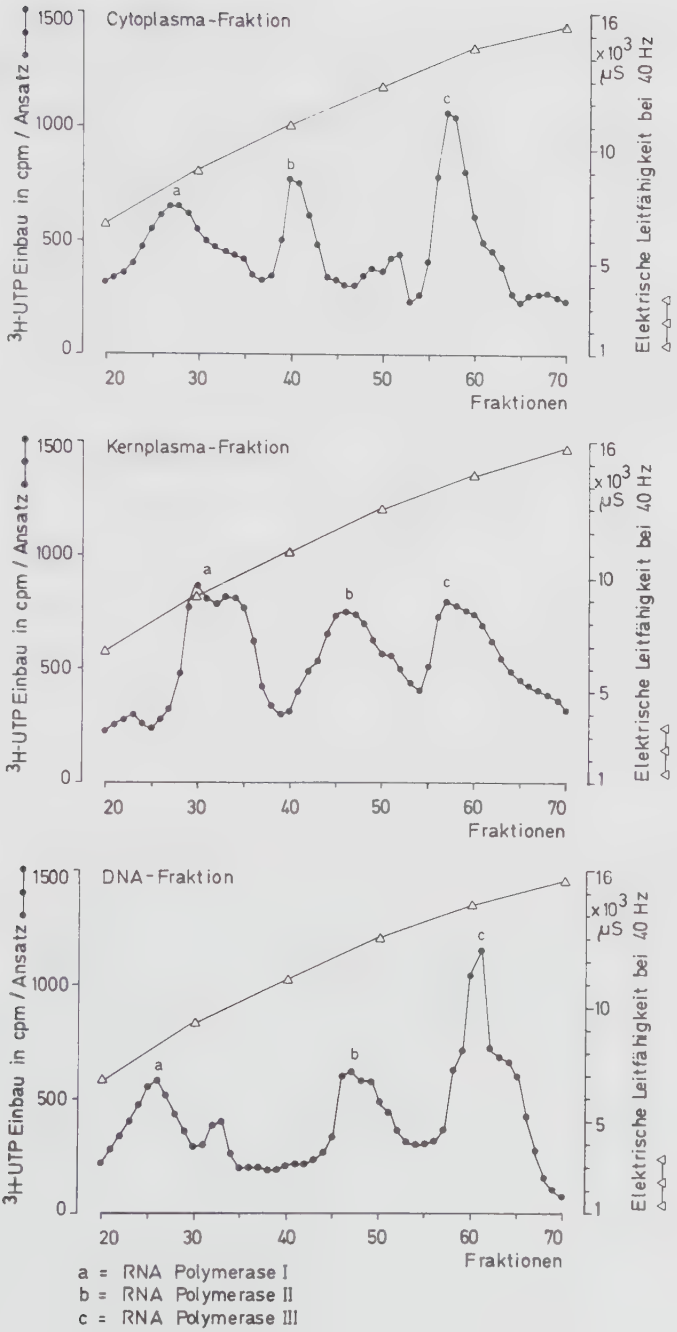
Zellkultur:	13 Tage
Auftrag:	1,25 mg Protein
Säule:	DEAE-Sephadex (0,3 x 20 cm)
Fraktionsgröße:	0,75 ml

Abb. 20-2: Chromatographie der Kernplasmafraktion aktivierter T-Lymphocyten an DEAE-Sephadex

Zellkultur:	13 Tage
Auftrag:	0,25 mg Protein
Säule:	DEAE-Sephadex (0,3 x 20 cm)
Fraktionsgröße:	0,75 ml

Abb. 20-3: Chromatographie der DNA-Fraktion aktivierter T-Lymphocyten an DEAE-Sephadex

Zellkultur:	13 Tage
Auftrag:	0,35 mg Protein
Säule:	DEAE-Sephadex (0,3 x 20 cm)
Fraktionsgröße:	0,75 ml


Cytoplasma-Fraktion
Kernplasma-Fraktion
DNA-Fraktion
^{3}H-UTP Einbau in cpm / Ansatz
Elektrische Leitfähigkeit bei 40 Hz
x 10^3 µS
Fraktionen
a
b
c
a = RNA Polymerase I
b = RNA Polymerase II
c = RNA Polymerase III

Bei den Zellen der Kultur nach 13 Tagen ließen sich in allen Zellfraktionen die drei RNA-Polymerase-Klassen nachweisen (Abb. 20-1 - 20-3). Nach dem α-Amanitin-Versuch an intakten, aktivierten T-Lymphocyten wäre eine erhöhte RNA-Polymerase-III-Aktivität zu erwarten (Tab. 4). Es entfielen 82,1 % der RNA-Polymerase-Aktivität auf die RNA-Polymerase III, 5,2 % auf RNA-Polymerase II und 12,7 % auf RNA-Polymerase I.

In allen Zellfraktionen wurde auch nach Chromatographie bei der RNA-Polymerase III der höchste ^{3}H-UTP-Einbau gemessen. In der Cytoplasmafraktion und in der Kernplasmafraktion baute sie maximal 8,5 pMol ^{3}H-UTP und in der DNA-Fraktion maximal 9,3 pMol ^{3}H-UTP ein (Abb. 20-1 - 20-3). Die RNA-Polymerase-Fraktionen nach Chromatographie wurden gepoolt und der ^{3}H-UTP-Einbau erneut gemessen (Tab. 5).

Fraktion	pMol ^{3}H-UTP/50 µl Enzymlösung, RNA-Polymerase:		
	I	II	III
CF	4,1	4,6	6,1
KF	5,2	5,0	5,7
DF	3,2	4,0	5,6

Tab. 5: ^{3}H-UTP-Einbau der RNA-Polymerasen (Pool) nach Chromatographie

Eine höhere RNA-Polymerase III-Aktivität konnte nachgewiesen werden. Das Aktivitätsverhältnis der RNA-Polmyerasen zueinander entspricht jedoch nicht den Vergleichswerten an intakten, aktivierten T-Lymphocyten (Tab. 4).

Der durch die Chromatographie bedingte Aktivitätsverlust war in allen Fraktionen sehr hoch. Er betrug für die Cytoplasma - 37 %, für die Kernplasma - 23 % und für die DNA-Fraktion 47 %.

Die T-Lymphocyten der zweiten Kultur wurden am 15. Tag geerntet. In allen Zellfraktionen ließen sich die drei RNA-Polymerasen nachweisen (Abb. 21-1 bis 21-3).

Das Aktivitätsverhältnis der RNA-Polymerasen I, II, III betrug in intakten Zellen zu diesem Zeitpunkt nach dem α-Amanitin-Versuch für die RNA-Polymerase I 79,2 % gegenüber der RNA-Polymerase-II mit 5,5 % und - III mit 17,3 % der Gesamtaktivität (Tab. 4). Im Unterschied zur 13-Tage-Zellkultur überwog hier die Aktivität der RNA-Polymerase I.

In allen Zellfraktionen wurde auch nach Chromatographie bei der RNA-Polymerase I der höchste ^{3}H-UTP-Einbau gemessen. Der maximale Einbau liegt in der Cytoplasmafraktion bei 15,6 pMol ^{3}H-UTP, in der Kernplasmafraktion wesentlich niedriger (1,2 pMol ^{3}H-UTP) und in der DNA-Fraktion bei 2,5 pMol ^{3}H-UTP (Abb. 21-1 - 21-3).

Die RNA-Polymerase-Fraktionen nach Chromatographie wurden gepoolt und der ^{3}H-UTP-Einbau erneut gemessen (Tab. 6).

Fraktion	pMol ^{3}H-UTP/50 µl Enzymlösung, RNA-Polymerase:		
	I	II	III
CF	11,1	2,8	2,2
KF	0,8	0,7	0,7
DF	1,5	1,1	1,2

Tab. 6: ^{3}H-UTP-Einbau der RNA-Polymerasen (Pool) nach Chromatographie

Eine erhöhte RNA-Polymerase I-Aktivität, besonders in der Cytoplasmafraktion, konnte nachgewiesen werden. Die Aktivität aller RNA-Polymerasen in der Kernplasma- und DNA-Fraktion ist allerdings, verglichen mit der Cytoplasmafraktion, gering. Auch ist die Aktivität der RNA-Polymerase I in der Kernplasma- und DNA-Fraktion nur wenig höher, als die der beiden übrigen RNA-Polymerasen. Das Aktivitätsverhältnis der RNA-Polymerasen entspricht jedoch nicht den Vergleichswerten intakter,

Abb. 21-1: Chromatographie der Cytoplasmafraktion aktivierter T-Lymphocyten an DEAE-Sephadex

Zellkultur:	15 Tage
Auftrag:	1,3 mg Protein
Säule:	DEAE-Sephadex (0,3 x 20 cm)
Fraktionsgröße:	0,75 ml

Abb. 21-2: Chromatographie der Kernplasmafraktion aktivierter T-Lymphocyten an DEAE-Sephadex

Zellkultur:	15 Tage
Auftrag:	0,53 mg Protein
Säule:	DEAE-Sephadex (0,3 x 20 cm)
Fraktionsgröße:	0,75 ml

Abb. 21-3: Chromatographie der DNA-Fraktion aktivierter T-Lymphocyten an DEAE-Sephadex

Zellkultur:	15 Tage
Auftrag:	0,55 mg Protein
Säule:	DEAE-Sephadex (0,3 x 20 cm)
Fraktionsgröße:	0,75 ml

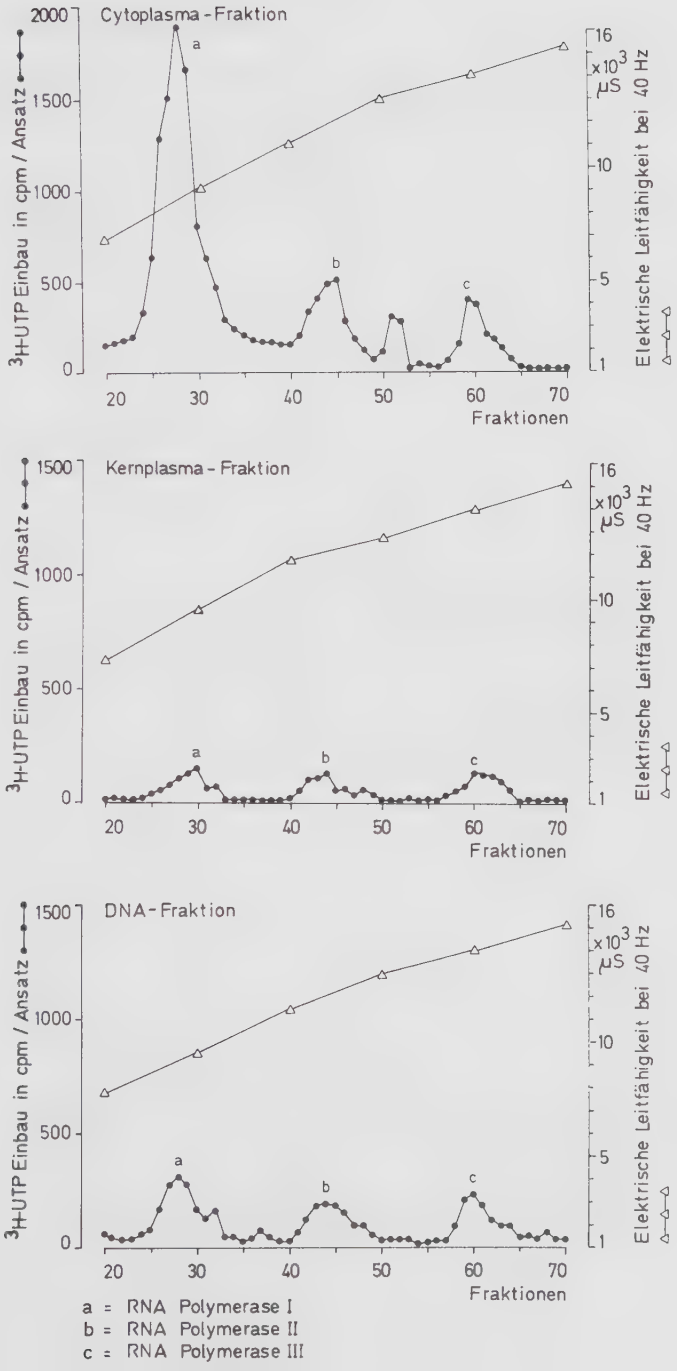

Cytoplasma - Fraktion
Kernplasma - Fraktion
DNA - Fraktion
^{3}H-UTP Einbau in cpm / Ansatz
Elektrische Leitfähigkeit bei 40 Hz
x10^3 µS
Fraktionen
a
b
c
a = RNA Polymerase I
b = RNA Polymerase II
c = RNA Polymerase III

Abb. 22-1: Chromatographie der Cytoplasmafraktion aktivierter T-Lymphocyten an DEAE-Sephadex

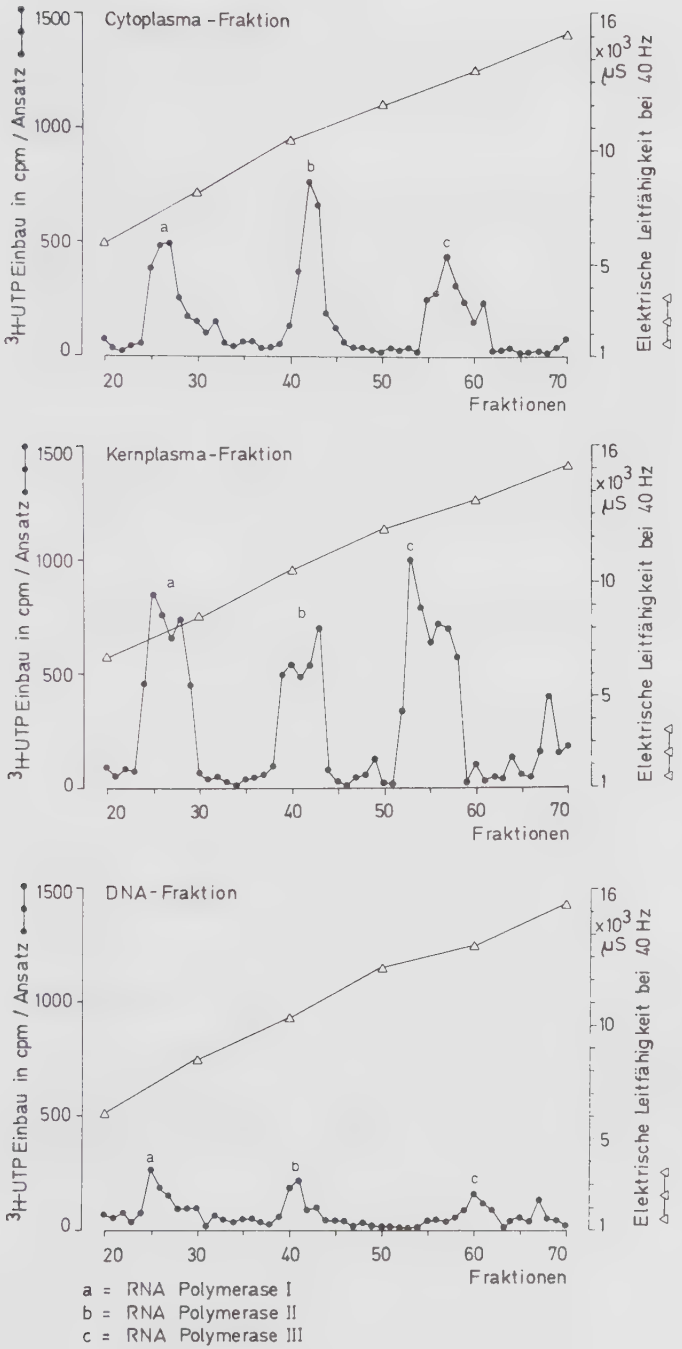
Zellkultur:	21 Tage
Auftrag:	0,25 mg Protein
Säule:	DEAE-Sephadex (0,3 x 20 cm)
Fraktionsgröße:	0,75 ml

Abb. 22-2: Chromatographie der Kernplasmafraktion aktivierter T-Lymphocyten an DEAE-Sephadex

Zellkultur:	21 Tage
Auftrag:	0,25 mg Protein
Säule:	DEAE-Sephadex (0,3 x 20 cm)
Fraktionsgröße:	0,75 ml

Abb. 22-3: Chromatographie der DNA-Fraktion aktivierter T-Lymphocyten an DEAE-Sephadex

Zellkultur:	21 Tage
Auftrag:	0,13 mg Protein
Säule:	DEAE-Sephadex (0,3 x 20 cm)
Fraktionsgröße:	0,75 ml


Cytoplasma - Fraktion
Kernplasma-Fraktion
DNA - Fraktion
^{3}H-UTP Einbau in cpm / Ansatz
Elektrische Leitfähigkeit bei 40 Hz
x10^3 µS
Fraktionen
a
b
c
a = RNA Polymerase I
b = RNA Polymerase II
c = RNA Polymerase III

aktivierter T-Lymphocyten (Tab. 4). Der durch die Chromatographie bedingte Aktivitätsverlust jeder Zellfraktion betrug für die Cytoplasma - 37 %, für die Kernplasma-5 % und die DNA-Fraktion 4 %.

Bei den Zellen der Kultur nach 21 Tagen ließen sich in allen drei Zellfraktionen ebenfalls die drei RNA-Polymeraseklassen nachweisen (Abb. 22- 1 - 22-3).
Das Aktivitätsverhältnis an intakten, aktivierten T-Lymphocyten ließ sich zu diesem Zeitpunkt nicht errechnen, da im α-Amanitin-Versuch die RNA-Polymerase III (Zugabe von 200 µg α-Amanitin/ml) scheinbar nicht gehemmt wurde. Hier war der ^{3}H-UTP-Einbau höher als der ^{3}H-UTP-Einbau mit 1 µg α-Amanitin/ml. Die Cytoplasma- und Kernplasmafraktion enthielten die höchsten Aktivitäten. Die höchsten ^{3}H-UTP-Einbauraten liegen zwischen 3,5 und 6,1 pMol ^{3}H-UTP (CF) und 5,6 und 8,1 pMol ^{3}H-UTP (KF). Keine der RNA-Polymerasen dominierte in allen drei Zellfraktionen (Abb. 22-1 - 22-3).
Die RNA-Polymerase-Fraktionen nach Chromatographie wurden gepoolt und der ^{3}H-UTP-Einbau erneut gemessen (Tab. 7).

Fraktion	pMol ^{3}H-UTP/50 µl Enzymlösung, RNA-Polymerase:		
	I	II	III
CF	3,2	4,0	2,4
KF	5,3	4,5	5,5
DF	1,2	1,1	0,9

Tab. 7: ^{3}H-UTP-Einbau der RNA-Polymerasen (Pool) nach Chromatographie

Eine Aussage über das Aktivitätsverhältnis der RNA-Polymerasen zueinander läßt sich auch hier nicht treffen.
Allerdings ist die Aktivität der RNA-Polymerase II relativ zur Aktivität der RNA-Polymerasen I- und II hier, wie auch nach 13 und 15 Tagen-Zellkultur nach Chromatographie viel höher als in intakten Zellen (Tab. 4).

Der durch die Chromatographie bedingte Aktivitätsverlust jeder Zellfraktion betrug für die Cytoplasma - 20 %, Kernplasma - 35 % und die DNA-Fraktion 80 %.

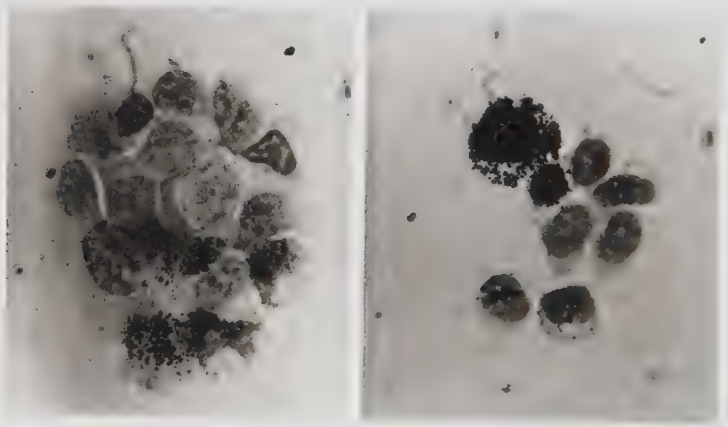
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in allen Interleukin 2 (IL 2)-abhängigen T-Lymphocyten der Nachweis für die drei RNA-Polyermasen erbracht werden konnte. Das Aktivitätsverhältnis der RNA-Polymerasen nach dem α-Amanitin-Versuch an intakten Zellen ließ sich nach der Chromatographie an DEAE-Sephadex in den Zellfraktionen nicht darstellen.
Allerdings konnte gezeigt werden, daß nach 13 Tagen Zellkultur die Aktivität der RNA-Polymerase III (in intakten Zellen 82,1 % der Gesamtaktivität) auch nach der Chromatographie dominierte. Nach 15 Tagen Zellkultur war die Aktivität der RNA-Polymerase I nach Chromatographie, wie auch in intakten Zellen (79,2 % der Gesamtaktivität) höher als die RNA-Polymerase II- und III-Aktivität.

3.10.
Autoradiographische Darstellung von Interleukin 2 (IL 2)-abhängigen T-Lymphocyten

Bei der Autoradiographie handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Ort und Verteilung spezifisch markierter Zellprodukte in einer Zelle sichtbar gemacht werden.
In diesem Versuch wurden PHA-aktivierte Interleukin 2 (IL 2)-abhängige T-Lymphocyten nach 13 Tagen und 15 Tagen Zellkultur mit ^{3}H-Thymidin markiert. Ebenso wurden zum selben Zeitpunkt IL 2-abhängige T-Lymphocyten mit α-Amanitin vorbehandelt und anschließend mit ^{3}H-UTP markiert, um die Aktivität der RNA-Polymerasen zu bestimmen.
Die Zellen wurden mittels einer Cytozentrifuge auf Objektträger aufgetragen und fixiert. Der Einbau von ^{3}H-Thymidin und ^{3}H-UTP wurde nach der beschriebenen Methode (2.13.) sichtbar gemacht. Der ^{3}H-Thymidineinbau und ^{3}H-UTP-Einbau wurde im Parallelversuch im Scintillationszähler gemessen.
Die grains auf den Objektträgern wurden ausgezählt.

Die Abbildung 23 zeigt Zellen, wie sie sich in der Autoradiographie darstellten. Es ist zu erkennen, daß es sich um lymphoblastische Zellen handelt. Der ^{3}H-UTP-Einbau ist im Zellkern und im Cytoplasma sichtbar.

In Abb. 24 und Tab. 21 sind die Zählergebnisse der Autoradiographie und die Werte der Scintillationsmessung der 13-Tage-Zellkultur zusammengefaßt.



a b

Abb. 23: Fotographische Darstellung von T-Lymphocyten im Autoradiographie-Versuch.

a) Zellen mit 200 µg α-Amanitin/ml
b) Zellen ohne α-Amanitin

Markierung: ^{3}H-UTP
Inkubation der Zellen vor Markierung: 13 Tage
Färbung: Toluidin-Blau, 50 Minuten
Vergrößerung: 1000 x

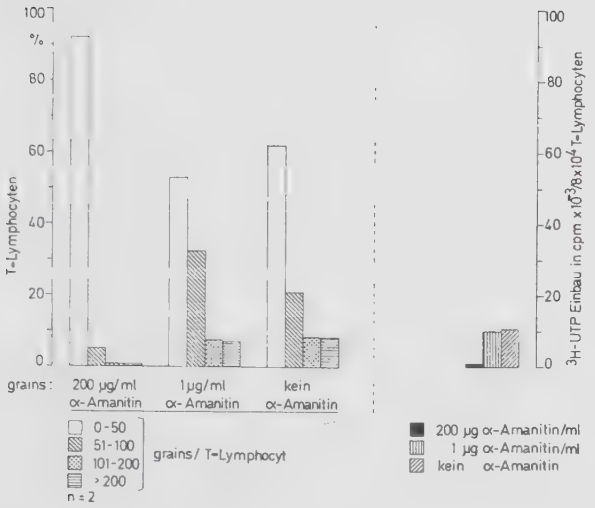


Abb. 24 a: I. ^{3}H-UTP-Einbau (Autoradiographie) in PHA-aktivierte Interleukin 2 (IL 2)-abhängige T-Lymphocyten nach einer Kulturdauer von 13 Tagen.

II. ^{3}H-UTP-Einbau (Scintillationsmessung)

Aus den Ergebnissen läßt sich folgendes ersehen:
Bei den IL 2-abhängigen T-Lymphocyten, die im α-Amanitin-Versuch mit 200 µg/ml inkubiert wurden, betrug der ^{3}H-UTP-Einbau nach Scintillationsmessung 1359 cpm. Der ^{3}H-UTP-Einbau im Parallelversuch in der Autoradiographie wurde ausgezählt. 92 % der Zellen hatten 0 - 50 grains, 5,4 % 51 - 100 und 1,4 % 100 - 200 grains pro Zelle. Nur 1,2 % der T-Lymphocyten hatten mehr als 200 grains.

Bei den T-Lymphocyten im ∝-Amanitin-Versuch mit 1 µg/ml wurde in der Scintillationsmessung ein ^{3}H-UTP-Einbau von 10 203 cpm gemessen. Hier hatten in der Autoradiographie 7,3 % der Zellen mehr als 200 grains (Abb. 24 a).
Die Kontrollzellen, die kein ∝-Amanitin enthielten, wiesen in der Scintillationsmessung einen ^{3}H-UTP-Einbau von 10 690 cpm auf. Hier waren 8,4 % der Zellen mit mehr als 200 grains/Zelle. In beiden Ansätzen waren also die übrigen 90 % der Zellen relativ inaktiv. Sie hatten weniger als 200 grains/Zelle. Es ist hervorzuheben, daß die Werte einer Messung im Scintillationszähler offensichtlich auf nur wenige, sehr aktive Zellen zurückzuführen sind, wie sich in der Autoradiographie herausstellte.

Parallel zu diesen T-Lymphocyten wurden T-Lymphocyten derselben Kulturen mit ^{3}H-Thymidin markiert, um die Replikationsrate der Zellen zu untersuchen und die Verteilung dieser Aktivität unter den Zellen zu beobachten. Es wurden 300 Zellen pro Objektträger ausgezählt (Abb. 24 b). 88,7 % der Zellen hatten weniger als 50 grains. 8,7 % der Zellen hatten mehr als 200 grains. Die Ergebnisse zeigen hier ebenfalls, daß der in der Scintillationsmessung meßbare ^{3}H-Thymidineinbau (26 926 cpm) in erster Linie von 8,7 % der Zellen verursacht wird; also ca. 10 % der Zellen ihre DNA zur Zeit einer Messung verdoppeln.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die ^{3}H-UTP-Einbaurate der mit 200 µg ∝-Amanitin/ml exponierten Zellen in der Autoradiographie herabgesetzt ist, wie sich nach den meßbaren (cpm) Einbauraten 1 369 cpm/$8x10^{4}$ Zellen vermuten ließ . Die Einbauraten mit 1 µg ∝-Amanitin/ml und ohne ∝-Amanitin/ml in der Scintillationsmessung lagen im Durchschnitt mit ca. 10 000 - 11 000 cpm ungefähr gleich. Diese, aber insgesamt höheren UTP-Einbauraten, drückten sich bei der Autoradiographie durch eine höhere grain-Zahl aus. 37 - 47 % der Zellen mit 1 µg ∝-Amanitin/ml oder keinem ∝-Amanitin hatten mehr als 50 grains gegenüber 11,3 der Zellen der Exponierung mit 200 µg ∝-Amanitin/ml. Der ^{3}H-Thymidineinbau betrug nach Scintillationsmessung 26 926 cpm. In der Autoradiographie hatten 8,7 % der Zellen mehr als 50 grains/Zelle.

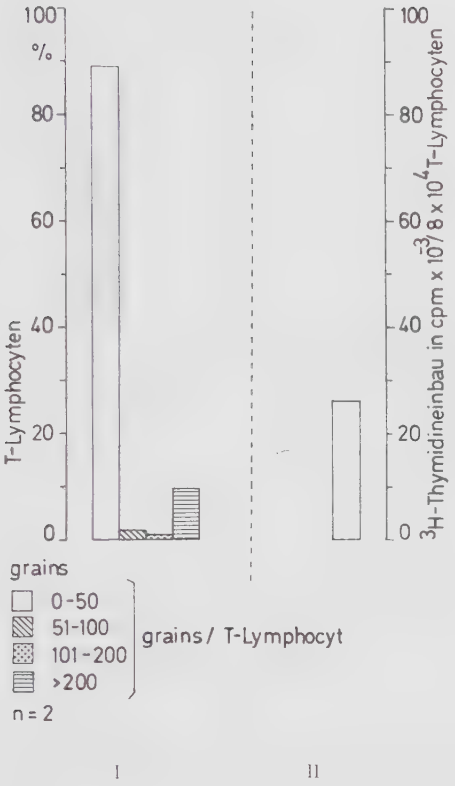


Abb. 24 b: I. ^{3}H-Thymidineinbau (Autoradiographie) in PHA-aktivierte Interleukin 2 (IL 2)-abhängige T-Lymphocyten nach einer Kulturdauer von 13 Tagen.

II. ^{3}H-Thymidineinbau (Scintillationsmessung)

Nach 15 Tagen Zellkultur wurde der Autoradiographie-Versuch mit weiteren 4 Zellkulturen IL 2-abhängiger T-Lymphocyten durchgeführt. Die ^{3}H-Thymidineinbaurate und die ^{3}H-UTP-Einbaurate in cpm wurde parallel dazu im Scintillationszähler gemessen (Abb. 25; Tab. 22).

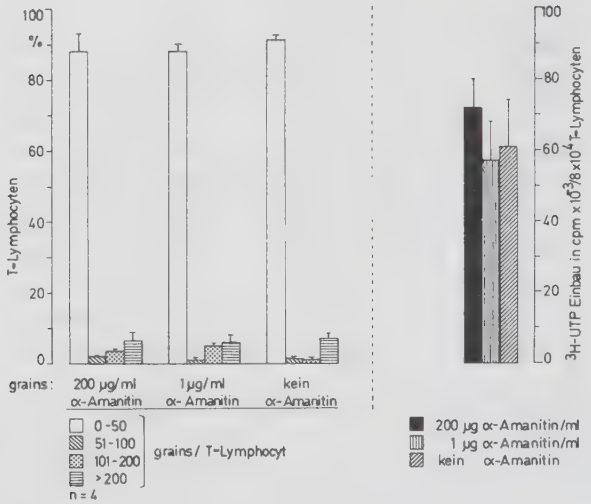


Abb. 25 a: I. ^{3}H-UTP-Einbau (Autoradiographie) in PHA-aktivierte Interleukin 2 (IL 2)-abhängige T-Lymphocyten nach einer Kulturdauer von 15 Tagen.

II. ^{3}H-UTP-Einbau (Scintillationsmessung)

Die Auswertung der Versuche zeigte, daß die im Scintillationszähler gemessenen Einbauraten von ^{3}H-UTP sehr hoch waren. Die Zellen zeigten in Gegenwart von 200 µg α-Amanitin/ml 71 594 ± 8 259 cpm. Dieser Wert liegt höher als der ^{3}H-UTP-Einbau ohne α-Amanitin (60 613 ± 12 812 cpm) und mit 1 µg α-Amanitin/ml (57 194 ± 11 513 cpm) in dem Versuchsansatz. Das bedeutet, daß eine Hemmung der RNA-Polymerasen II und III durch 200 µg α-Amanitin/ml nicht in allen Zellkulturen meßbar war. Vergleicht man diese Einbauraten mit den Ergebnissen der Autoradiographie zeigt sich, daß in allen Ansätzen weniger als 15 % der Zellen mehr als 50 grains hatten. Zu dem Zeitpunkt einer Messung haben offensichtlich nur ca. 15 % aller Zellen eine hohe RNA-Polymerase-Aktivität.

Der ^{3}H-Thymidineinbau wurde in Zellen derselben Zellkultur gemessen. Er lag in der Scintillationsmessung mit 26 451 cpm in einem mittleren Einbaubereich (Abb. 25 b). In der Autoradiographie wurden 8,5 % der Zellen

mit mehr als 200 grains ausgezählt.

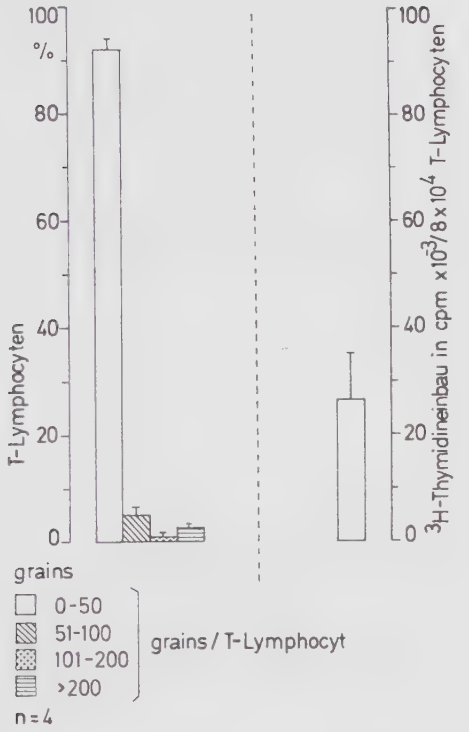


Abb. 25 b: I. ^{3}H-Thymidineinbau (Autoradiographie) in PHA-aktivierte Interleukin 2 (IL 2)-abhängige T-Lymphocyten nach einer Kulturdauer von 15 Tagen.

II. ^{3}H-Thymidineinbau (Scintillationsmessung)

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der ^{3}H-UTP-Einbau in den Zellen nach einer Kulturdauer von 15 Tagen sehr hoch war, gemessen in der Scintillationsmessung. In der Autoradiographie war die Anzahl der Zellen mit mehr als 200 grains/Zelle jedoch gering (ca. 7 %). Es kam deutlich zum Ausdruck, daß im Scintillationszähler meßbare, hohe Einbauraten offensichtlich nur auf wenige aktive Zellen zurückzuführen sind.
Der ^{3}H-Thymidineinbau betrug nach Scintillationsmessung 26 451 cpm. In der Autoradiographie hatten ca. 8,5 % der Zellen mehr als 50 grains/Zelle.
Die Verhältnisse im ^{3}H-Thymidineinbau entsprachen den Ergebnissen des ^{3}H-UTP-Einbaus. In der Autoradiographie verteilten sich die hohen Einbauraten auf nur wenige Zellen.

3.11.

Tabellarischer Anhang (Tabellen 8 bis 22)

		^{3}H-Thymidineinbau (cpm) / 200 µl Zellkultur					
Konzentration in %		50	20	10	5	2,5	K_o
K	$\bar{x}$	860	1 485	833	560	470	247
	s	513	648	394	136	230	120
F	$\bar{x}$	6 139	2 282	1 545	939	941	263
	s	629	596	493	110	213	40
D	$\bar{x}$	44 510	28 726	24 684	12 313	6 132	429
	s	2 005	1 065	1 268	798	159	53

Tab. 8: Interleukin 2 (IL 2)-Nachweis in 6 Kulturüberständen (K), n = 6, dem daraus gewonnenen Filtrat (F), Dialysat (D) und Fraktionspool 82 - 96 (P), n = 3,
K_o = Mediumkontrolle, n = 3.
Die Werte geben den ^{3}H-Thymidineinbau in cpm an.
Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur: 1 x 10^5
Inkubation: 3 Tage, 37 °C, 5 % CO_2

(s. Abb. 3)

Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des IL 2 Nachweistests, der Interferon-Nachweistests und der Proteinbestimmung nach Gelfiltration des Dialysats (s. Abb. 5).

Fraktion:	^{3}H-Thymidineinbau in cpm/1x10^5 T Lymphocyten, Interleukin 2-Medium Konzentration in %					Proteinkonzentration	Interferontiter
	50	20	10	5	2,5	in mg/ml	
0-50	-	-	-	-	-	-	-
52	285	212	486	268	650	0,15	-
56	332	256	563	251	643	2,5	-
60	396	192	426	364	498	3,0	32
64	660	368	545	339	1129	3,5	32
68	549	456	723	471	707	7,0	64
72	1276	1316	897	659	721	8,0	64
74	671	633	844	738	991	8,3	64
76	524	579	1472	1435	2120	8,5	64
78	870	901	1447	965	1212	8,4	64
80	4647	2182	1998	984	1384	7,5	64
82	3861	1812	1220	1192	952	6,5	64
84	31515	37695	28261	12752	5302	5,0	64
86	36682	34060	32836	13890	10326	4,0	64
88	47321	35844	25220	10894	4768	3,0	8
90	42171	30553	17551	6696	3965	2,5	-
92	33316	25682	11723	4448	3113	2,5	-
94	25248	12787	4576	1996	1290	0,2	-
96	9101	2531	2632	1468	1308	0,1	-
98	6308	2430	1412	1250	868	0,08	-
00	3963	2816	2610	1561	916	0,07	-
02	4116	2375	2308	1376	1096	0,05	-
04	6868	3688	2132	1853	1986	0,05	-
06	8119	4171	4297	1864	1372	0,05	-
08	5284	3114	2817	1434	1184	0,05	-
10	3854	1770	2282	7184	1944	0,05	-
12	7880	5906	3872	3286	2599	0,05	-
14	8125	4972	3441	2073	1230	0,05	-
16	6088	3048	1822	1340	1181	0,05	-
18	5660	2197	1440	780	696	0,05	-
20	6504	2463	1844	902	1299	0,05	-
21-130	3044	1368	1117	904	1464	0,05	-

ontrolle ohne IL 2: 298 ± 83 cpm, n=26

	^{3}H-Thymidineinbau (cpm) / 200 µl Kultur					
	Interleukin 2-Medium Konzentration					Kontrolle
	50	20	10	5	2,5	ohne IL
$\bar{x}$	37 844	19 200	9 634	4 487	3 098	624
s	4 850	6 985	3 715	2 119	1 621	258

Tab. 10: Bestimmung der Interleukin 2-(IL 2)-Medium-Konzentration zur Erhaltung IL 2-abhängiger T-Lymphocyten, n=7.

Die Werte geben den ^{3}H-Thymidineinbau in cpm an.

Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur = $1x10^5$
Inkubation: 3 Tage, 37 °C, 5 % CO_2
(s. Abb. 7)

		^{3}H-Thymidineinbau (cpm) / 200 µl Kultur			
	Kultur	Tage-Zellkultur			
		7	10	13	16
IL-Zugabe alle 3 Tage	1	3 014	16 767	13 655	11 318
	2	6 699	27 818	19 446	12 656
einmalige IL 2-Zugabe	1	3 014	16 767	6 125	1 628
	2	6 699	27 818	5 306	1 019
keine IL 2-Zugabe	1	3 014	4 938	1 341	591
	2	6 699	874	635	412

Tab. 11: ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA IL 2-abhängiger T-Lymphocyten nach IL 2-Zugabe zu verschiedenen Zeiten.

Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur: = $1x10^5$
Inkubation: 37 °C, 5 % CO_2
(s. Abb. 8)

^{3}H-Thymidineinbau (cpm) / 200 µl Kultur

Kultur	Tage						
	1	2	3	4	5	6	7
MLC 1	768	768	860	1 218	2 014	6 955	4 582
MLC 2	530	640	945	1 281	3 245	11 022	14 342
*R-Zellen 1	535	568	487	569	809	1 024	-
R-Zellen 2	733	688	919	978	1 435	2 015	-
*S-Zellen	353	325	785	382	205	291	-

Tab. 12: Aktivierung von T-Lymphocyten in einer Lymphocyten-Mischkultur (MLC).

Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur = $2x10^5$
Inkubation: 37 °C, 5 % CO_2
(s. Abb. 9)

Anzahl abgestorbener Zellen (%)

Kultur	Tage						
	1	2	3	4	5	6	7
MLC 1	6	6	15	25	30	50	52
MLC 2	2	3	12	20	15	30	23
*R-Zellen 1	5	2	4	5	9	20	42
R-Zellen 2	5	6	7	9	15	15	26
*S-Zellen	11	17	49	75	85	97	99

Tab. 13: Aktivierung von T-Lymphocyten in einer Lymphocyten-Mischkultur (MLC).

Auswertung durch Vitalitätstest
(s. Abb. 9)

* R-Zellen = Responder Zellen
* S-Zellen = Stimulator Zellen

Tabelle 14

Wachstumsverhalten aktivierter Interleukin 2 (IL 2)-abhängiger T-Lymphocyten in einer Langzeitkultur unter Zugabe von 20 % IL 2-Medium im Abstand von 3 Tagen (s. Abb. 10 - 12).

Tage	Kultur 1			Kultur 2		
	^{3}H-Thymidin-einbau [cpm/200 µl Kultur]	Zelldichte x 10^5/ml	Gesamt-zellzahl x 10^8	^{3}H-Thymidin-einbau [cpm/200 µl Kultur]	Zelldichte x 10^5/ml	Gesamt-zellzahl x 10^8
2	580	-	-	723	-	-
7	3014	4,6	0,46	6699	4,6	0,46
10	16767	3,8	0,42	27818	3,0	0,39
13	13655	9,3	0,66	19446	6,0	0,5
16	11318	8,0	0,85	12656	6,0	0,55
19	38472	9,0	1,2	26816	6,0	0,61
22	29328	9,4	1,7	17983	7,0	0,73
25	9883	5,0	1,7	5895	4,0	0,66
28	1212	3,5	1,5	1519	4,6	0,7
31	1000	5,5	1,8	825	3,0	0,59
34	5183	8,4	2,3	4500	10,0	1,0
37	21267	5,4	3,5	15464	11,0	1,6
40	8459	8,7	4,8	5747	13,0	3,0
43	4641	6,3	5,4	5902	5,5	3,2
46	1353	4,2	4,9	3305	3,7	2,7
49	579	3,5	4,6	2178	3,1	2,6
52	450	2,8	4,3	2355	2,4	2,4

^{3}H-Thymidineinbau (cpm) / 200 µl Kultur

	1 % PHA, 20 % IL 2-Medium	MLC
$\bar{x}$	35 368	13 892
s	8 085	7 564
n	12	10

Tab. 15: ^{3}H-Thymidineinbau in T-Lymphocyten aktiviert durch 1 % PHA plus 20 % IL 2-Medium oder eine MLC.
Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur = $2x10^{5}$
Inkubation 5 Tage, 37 °C, 5 % CO_2
(s. Abb. 13)

^{3}H-Thymidineinbau (cpm) / 200 µl Kultur

Tage		8	11	14
Kulturansatz:				
+ 20 % IL 2-Medium	$\bar{x}$	13 340	13 765	39 137
	s	685	1 526	841
ohne IL 2, ohne PHA	$\bar{x}$	855	500	328
	s	140	123	152
mit 1 % PHA	$\bar{x}$	11 376	1 805	544
	s	778	699	298
mit 0,5 % PHA	$\bar{x}$	10 918	888	524
	s	265	258	198
mit 0,25 % PHA	$\bar{x}$	10 481	380	510
	s	1 159	36	225
mit 0,1 % PHA	$\bar{x}$	10 582	218	388
	s	2 014	75	13

Tab. 16: PHA-Abhängigkeit aktivierter T-Lymphocyten in Langzeitkultur, gemessen durch den ^{3}H-Thymidineinbau (cpm)/ 200 µl Kultur, n = 4.
Ausgangszellzahl in 200 µl Kultur = $1x10^{5}$
Inkubation: 37 °C, 5 % CO_2
(s. Abb. 14)

Tage		^{3}H-UTP-Einbau (cpm)		
		α-Amanitinkonzentration (µg/ml)		
		200	1	0
2	$\bar{x}$	764	922	563
	s	71	116	139
3	$\bar{x}$	990	1763	1788
	s	139	359	100
4	$\bar{x}$	2759	5108	5980
	s	375	720	926
5	$\bar{x}$	2526	5317	5705
	s	463	1052	1090
6	$\bar{x}$	2038	9651	9760
	s	684	2850	2160
7	$\bar{x}$	1294	3358	4503
	s	650	985	2338
8	$\bar{x}$	1275	3629	2281
	s	520	1070	1093
9	$\bar{x}$	1685	6472	7194
	s	558	990	993
10	$\bar{x}$	2516	5578	4851
	s	590	458	477
11	$\bar{x}$	1450	4984	4039
	s	647	1796	1318
12	$\bar{x}$	1981	7582	9843
	s	570	2943	3598
13	$\bar{x}$	2183	8057	19751
	s	772	2389	8172
14	$\bar{x}$	34648	46738	50896
	s	2766	8884	10117
15	$\bar{x}$	65372	59389	62797
	s	3163	10427	10877

Tab. 17: ^{3}H-UTP-Einbau PHA-aktivierter T-Lymphocyten mit verschiedenen α-Amanitin-Konzentrationen.
Zellzahl: 8×10^4
Inkubation: 37 °C, 5 % CO_2
(s. Abb. 15)

Tage		RNA-Polymerase % Aktivität I	II	III
4	$\bar{x}$	35,1	10,5	54,4
	s	5,0	5,9	9,5
5	$\bar{x}$	36,0	13,0	49,7
	s	12,1	8,9	16,0
6	$\bar{x}$	20,0	9,2	71,0
	s	5,1	5,4	6,6
7	$\bar{x}$	19,3	7,3	69,3
	s	5,7	6,5	11,4
8	$\bar{x}$	18,6	9,7	69,8
	s	9,2	6,9	6,9
9	$\bar{x}$	23,1	14,6	62,2
	s	11,4	10,4	14,8
10	$\bar{x}$	37,0	16,2	46,9
	s	17,0	15,0	21,9
11	$\bar{x}$	24,8	9,0	66,1
	s	10,3	7,1	13,8
12	$\bar{x}$	36,8	8,0	55,2
	s	30,0	5,5	36,4
13*	$\bar{x}$	12,8	4,9	82,3
	s	-	-	-
14*	$\bar{x}$	64,0	17,4	18,6
	s	-	-	-
15	$\bar{x}$	69,3	12,1	18,6
	s	17,4	11,3	17,4

*n=2, nur Durchschnittswerte möglich

Tab. 18: Aktivität der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen PHA aktivierter T-Lymphocyten in %, n=4 (s. Abb. 16)

Tage		^{3}H-Thymidineinbau (cpm/8x10^4 Zellen)	Zelldichte (x10^5)	Gesamtzellzahl (x10^8)
2	$\bar{x}$	463	-	-
	s	327		
3	$\bar{x}$	3160	-	-
	s	860		
4	$\bar{x}$	17211	-	-
	s	3706		
5	$\bar{x}$	36295	5	0,5
	s	8290	0	0
6	$\bar{x}$	18244	5,8	0,54
	s	1769	1,9	0,18
7	$\bar{x}$	7926	8,3	0,9
	s	1751	2,4	0,26
8	$\bar{x}$	5809	9,8 (5,0)	1,17
	s	3138	1,8 0	0,2
9	$\bar{x}$	10470	5,1	1,19
	s	1694	1,9	0,3
10	$\bar{x}$	11827	5,6	1,31
	s	3030	1,1	0,25
11	$\bar{x}$	11945	7,4 (5,0)	1,78
	s	2682	1,8 0	0,43
12	$\bar{x}$	13577	5,4	1,92
	s	1966	1,1	0,4
13	$\bar{x}$	23819	6,0	2,15
	s	5903	1,3	0,47
14	$\bar{x}$	19622	8,4 (5,0)	3,18
	s	3226	1,7 0	0,64
15	$\bar{x}$	28100	4,2	2,67
	s	7393	0,6	0,38

Tab. 19: ^{3}H-Thymidineinbau (cpm), Wachstumsverhalten (Zellzahl/ml) und Gesamtzellzahl PHA-aktivierter T-Lymphocyten über einen Zeitraum von 15 Tagen. n=8
(s. Abb. 17, 18)

Tage		T-Lymphocyten	T-Helfer-Zellen	T-Suppressor-Zellen	Verhältnis T_H zu T_S Zellen
		%	%	%	
1	$\bar{x}$	46,6	48,0	19,8	2,4
	s	10,1	12,5	5,4	0,3
6	$\bar{x}$	65,5	50,8	46,2	1,1
	s	4,6	5,8	5,4	0,4
9	$\bar{x}$	96,7	33,9	63,4	0,53
	s	1,5	4,4	4,6	0,05
12	$\bar{x}$	96,7	28,8	71,1	0,41
	s	0,4	3,6	4,7	0,02
15	$\bar{x}$	98,9	22,9	77,8	0,3
	s	1,9	3,8	5,5	0,03

Tab. 20: Anteil der T-Lymphocyten und T-Lymphocyten-Subpopulationen in einer Zellkultur. n=6

Nachweis durch FITC-konjugierte monoklonale Antikörper
(s. Abb. 19)

		% Lymphocyten mit:				
	grains/ Zelle	0- 50	51- 100	100- 200	≥ 200	cpm/8x10^4 Zellen
^{3}H-UTP	200 µg	92,6	5,6	0,8	1,0	1553
	α-A./ml	91,3	5,3	2,0	1,4	1185
	Ø	92,0	5,4	1,4	1,2	1369
	1 µg	55,0	31,1	6,1	7,8	11629
	α-A./ml	50,6	33,9	8,7	6,8	8776
	Ø	52,8	32,5	7,4	7,3	10203
	kein	65,0	19,6	6,3	9,1	12274
	α-A.	59,6	21,8	10,9	7,7	9105
	Ø	62,3	20,7	8,6	8,4	10690
^{3}H-Thymidin		89,3	0,8	0	9,9	32843
		88,0	2,6	1,6	7,8	21009
	Ø	88,7	1,7	0,8	8,8	26926
		I				II

Tab. 21: I. ^{3}H-UTP-Einbau, ^{3}H-Thymidineinbau (Autoradiographie) in Interleukin 2 (IL 2)-abhängige T-Lymphocyten nach einer Kulturdauer von 13 Tagen.

II. ^{3}H-UTP-Einbau, ^{3}H-Thymidineinbau (Scintillationsmessung) (s. Abb. 24 a und b)

			% T Lymphocyten mit:				
	grains/ Zelle		0- 50	51- 100	101- 200	≥ 200	cpm/8x10^4 Zellen
^{3}H-UTP-Einbau	200 µg α-A./ml	$\bar{x}$	88,0	2,0	3,5	6,5	71594
		s	4,0	0,1	0,4	2,3	8259
	1 µg α-A./ml	$\bar{x}$	88,3	0,7	5,0	6,0	57174
		s	2,3	0,6	1,2	2,1	11513
	kein α-A.	$\bar{x}$	91,1	1,3	0,9	6,7	60613
		s	1,1	0,6	0,6	1,3	12812
^{3}H-Thymidin-einbau		$\bar{x}$	91,5	5,2	1,3	2,0	26451
		s	0,9	2,8	0,7	1,8	8104
			I				II

Tab. 22: I. ^{3}H-UTP-Einbau, ^{3}H-Thymidineinbau (Autoradiographie) in PHA-aktivierte Interleukin 2-abhängige T-Lymphocyten nach einer Kulturdauer von 15 Tagen. n=4

II. ^{3}H-UTP-Einbau, ^{3}H-Thymidineinbau

4. DISKUSSION

4.1.
Herstellung von Interleukin 2 (IL 2)

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit befaßte sich mit der Herstellung von mitogenfreiem Interleukin 2 (IL 2).
Interleukin 2 wird von T-Helfer-Lymphocyten nach Antigen- oder Mitogen-Reiz gebildet. Es ist für die Proliferation von aktivierten T-Suppressor-Lymphocyten erforderlich.

Zur Herstellung von Interleukin 2 sind inzwischen viele Möglichkeiten beschrieben worden. Das Prinzip ist jedoch bei allen Methoden zunächst gleich. T-Helfer-Zellen werden durch die Anwesenheit von akzessorischen Zellen (Monocyten) und einem Antigen/Mitogen zur IL 2-Synthese angeregt (GILLIS et al., 1982; PAULY et al., 1982; PAWELEC et al., 1982; WELTE et al., 1982).
Als IL 2 produzierende T-Zellen wurden häufig T-Helfer-Zellen aus der Milz, den Lymphknoten oder den Tonsillen beim Menschen (BÖDEKER et al., 1982; ROBB, 1982) sowie periphere Blutlymphocyten herangezogen (GILLIS et al., 1981; LOTZE und ROSENBERG, 1981).
Wir verwendeten zur Herstellung von IL 2 ausschließlich periphere Lymphocyten aus Humanblut. Das aus Kulturüberständen gewonnene IL 2 sollte möglichst mitogenfrei sein, um IL 2 abhängige Lymphocyten in Langzeitkultur zu erhalten.
Die Anwesenheit von Mitogenen, wie das Pflanzenlektin PHA, erschwert die Analyse der direkten Effekte von IL 2, da PHA ebenfalls einen wachstumsstimulierenden Effekt auf T-Zellen ausübt, der jedoch nur kurzfristig wirksam ist, wodurch die T-Zellen nicht in Langzeit-Kulturen erhalten werden können (GREAVES et al., 1972; LIS und SHARON, 1973; LOTZE und ROSENBERG, 1981). Weiterhin wurde beobachtet, daß Zellen, die in PHA-enthaltenden IL 2-Lösungen gewachsen sind, eine sog. Lektin-abhängige zelluläre Cytotoxizität (LDCC) ausprägen (ALVAREZ et al., 1978). Durch den Gebrauch von lektinfreiem IL 2 wird die LDCC ausgeschlossen (GRIMM und ROSENBERG, 1982).

Die für uns in Frage kommende Methode wurde von NOVOGRODSKY und Mitarbeitern (1980) beschrieben. Sie hat den Vorteil gegenüber allen anderen Methoden, daß die IL 2-Bildung nicht durch Lektine, sondern durch Neuraminidase und Galactoseoxidase verursacht wird. Nur ein kurzer Kontakt der Enzyme reicht aus, um die IL 2-Synthese auszulösen. Überschüssige Enzyme können durch Waschen der Lymphocyten entfernt werden. Bei den übrigen bekannten Methoden ist stets die Entfernung von PHA oder anderen Lektinen aus den Kulturüberständen notwendig. Dieser Schritt entfällt bei der Herstellung von IL 2 nach NOVOGRODSKY (1980).
Von Bedeutung bei der IL 2-Herstellung ist weiterhin die optimale Zelldichte, Kultivierungszeit und die Zugabe von Serum in die Nährmedien.

Die optimalen Konditionen für die IL 2-Herstellung in der von uns durchgeführten Weise waren eine Zelldichte von 10^6/ml und eine Inkubationszeit von 48 Stunden. Diese Bedingungen wurden auch von anderen Autoren eingehalten, die ihr IL 2 allerdings unter Einfluß von PHA herstellten (RUSCETTI et al., 1977; STRAUSSER und ROSENBERG, 1978; ALVAREZ et al., 1979; NEEFE et al., 1981).
Prinzipiell ist die Zugabe von Serum in das Kulturmedium bei der Herstellung von IL 2 umstritten. Während einige Arbeitsgruppen die Zugabe von inaktiviertem FCS empfehlen, wurde von BONNARD und Mitarbeitern (1980) ein hemmender Einfluß von FCS auf die IL 2-Synthese beschrieben. Es gibt jedoch sowohl Autoren, die in serumfreiem Medium kein IL 2 nachweisen konnten (GILLIS et al., 1980; ALOCER-VARELA, 1982; KAIEDA et al., 1982) als auch andere, die die Herstellung von IL 2 in serumfreiem Medium beobachteten (ALVAREZ et al., 1979; BONNARD und ALVAREZ, 1980; RUSCETTI und GALLO, 1981; WARREN und PEMBRY, 1981). Es wird vermutet, daß IL 2 in Abwesenheit von Proteinen instabil ist (MIER und GALLO, 1980). FABRICIUS und Mitarbeiter (1980)berichten,daß spezifische Serum-Proteine für die IL 2-Produktion benötigt werden.
Wir entschieden uns für die Zugabe von 1 % inaktiviertem AB-Serum , da in supplementiertem Medium die Überlebensrate von Lymphocyten höher liegt (BÖDEKER et al., 1982). So konnte weitgehend vermieden werden, daß durch vermehrt auftretende autolysierte Zellen Proteasen ins Medium entweichen . Zusätzlich konnte der Zusatz von 1 % AB-Serum

bei der Ammoniumsulfatfällung weitgehend eliminiert werden. Kleinere Polypeptide wurden durch die Ultrafiltration bis zu einem Molekulargewicht von 8000 ausgeschlossen.
Wie sich herausstellte, war die Konzentration des IL 2 in den Kulturüberständen für weitere Versuche zu gering, so daß die Kulturüberstände durch Ultrafiltration und anschließende Ammoniumsulfatfällung konzentriert wurden. Eine Reinigung über Gelfiltration wurde angeschlossen.
Zudem erweist sich die Aufklärung über die Wirkungsweise von IL 2 als schwierig, wenn das IL 2 ungereinigt oder nur teilweise gereinigt ist. Der Grund dafür ist darin zu sehen, daß Kulturüberstände zur Herstellung von IL 2 neben IL 2 auch andere Lymphokine und Cytokine mit möglichen biologischen Aktivitäten enthalten (WELTE et al., 1982).
Die IL 2-Nachweistests zeigten deutlich die zunehmende Konzentrierung des IL 2. Bei einer Konzentration von 50 % der verschiedenen Reinigungsstufen im Nachweistest stieg der ^{3}H-Thymidineinbau um das 52-fache an.

Die spezifische Aktivität (Aktivität /mg Protein) stieg nach Gelfiltration um das 7,5-fache an(spezifische Aktivität des Dialysats = 16 485 cpm/mg Protein, spezifische Aktivität des Fraktionspools = 124 107 cpm/mg Protein), obwohl ein Verlust der Gesamtaktivität von 10 - 30 % hingenommen werden mußte. In den Fraktionen der Gelfiltration ist eine IL 2-Aktivität nach dem Hauptpeak (- zwischen der 80. und 96. Fraktion -) noch bis zur 130. Fraktion nachweisbar. Es tritt also stark verzögert noch IL 2 aus der Säule . Wahrscheinlich wird IL 2 durch Adsorption an Oberflächen zunächst am Austritt gehindert, denn IL 2 hat die Eigenschaft, an Oberflächen zu adsorbieren, wenn es in verdünnter Proteinlösung vorliegt (ROBB, 1982).
Die Auftrennung des Dialysats durch Gelfiltration zeigte, daß das hier hergestellte IL 2 ein Molekulargewicht von 15 - 20 000 besitzt. Aktivitäten in höheren Molekulargewichtsbereichen konnten nicht nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht von humanem IL 2 kann jedoch schwanken (GILLIS et al., 1980). Diese Arbeitsgruppe wies IL 2-Aktivität in 4 Molekulargewichtsbereichen von 15 000 - 80 000 nach, wobei durch Dialyse in 0,5 M NaCl Lösung und eine wiederholte Säulenchromatographie nur noch Aktivitäten bei einem Molekulargewicht von 15 000 nachweisbar waren. Eine Bildung von Aggregaten aus der 15 000 Untereinheit konnte nicht ausgeschlossen werden.

RUSCETTI und GALLO (1981) beschrieben ebenfalls ein unterschiedliches Molekulargewicht des IL 2, was sich von 23 000 nach einer Gelfiltration auf 13 000 nach einer SDS-Gelelektrophorese verkleinerte. Diese Form wird als Monomer der 23 000 Form beschrieben. Unterschiedliche Molekulargewichte nach Gelfiltration wurden von WELTE und Mitarbeitern (1982) beobachtet, je nach Herkunft des IL 2. Es scheint also eine molekulare Heterogenität von IL 2 zu existieren. Es konnte nachgewiesen werden, daß das Molekulargewicht von IL 2 von seinem Glykosylations- und Sialysationszustand abhängig ist (ROBB, 1982).
In dieser Arbeit wurde das IL 2 zur Darstellung für eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese denaturiert.
Es hatte eine Bande in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 17 000. Unsere Befunde stimmten mit den Ergebnissen anderer Autoren überein, die bei denaturiertem IL 2 immer einen Molekulargewichtsbereich von 14 000 bis 17 000 angeben (GILLIS et al., 1980; SMITH, K.A., 1980; WELTE et al., 1982). Die Verschiedenartigkeit im Molekulargewicht nach Denaturierung ist noch ungeklärt; sie ist vermutlich auf eine unterschiedliche Glykosylierung zurückzuführen (ROBB und SMITH, 1981). Das in dieser Arbeit dargestellte IL 2 fügt sich in die Reihe der heterogenen IL 2 Moleküle ein. Dabei ist bislang unklar, ob die differenten Molekülformen unterschiedliche Funktionen haben und ob es immer dieselben T-Zellen sind, die verschiedene IL 2-Moleküle bilden, oder ob es sich jeweils um verschiedene Untergruppen der T-Helfer-Zellen handelt. In dieser Arbeit kann jedoch davon ausgegangen werden, daß es sich um eine T-Zellgruppe handelt, die immer das gleiche IL 2-Molekül bildet, da es nach einem einheitlichen Aktivitätsverfahren hergestellt und aufgearbeitet wurde.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, führt eine IL 2-Herstellung stets auch zur Bildung von Interferon. In unseren Untersuchungen konnten wir ebenfalls den Nachweis für Interferon in den Kulturüberständen erbringen. Es scheint gesichert zu sein, daß γ-Interferon (γ-IFN) durch antigene oder mitogene Reize gebildet wird, aber auch eine Induktion durch IL 2 scheint nicht ausgeschlossen zu sein (YAMAMOTO et al., 1982).
Im Rahmen der vorliegenden Experimente war es uns nicht möglich nachzuweisen, daß es sich um γ-IFN handelt. Es ist jedoch davon auszugehen, daß γ-IFN auf einen mitogenen/antigenen Reiz hin gebildet wird und das auch in Frage

kommende α-IFN ausschließlich auf virale Reize hin von Leukocyten gebildet wird.
In unseren Experimenten wurde IFN durch den cytopathischen Effekt (CPE) - Reading Assay mit Titern von $\geq$ 64 nachgewiesen. Nach der Gelfiltration konnte es zusammen mit IL 2 in gepoolten Fraktionen durch eine SDS-Gelelektrophorese dargestellt werden. Sein Molekulargewicht lag hier bei ca. 25 000.
Eine Trennung von IL 2 und IFN wurde von uns nicht vorgenommen, da durch die Aktivierung von T-Zellen in Langzeitkulturen ebenfalls IFN gebildet wird und stets in dem Kulturmedium vorhanden ist.
HANDA und Mitarbeiter (1983) beschreiben, daß NK-Zell-Klone, die in IL 2-haltigen Medien wuchsen, IFN bildeten und daß IL 2 zusätzlich die NK-Klone zur Proliferation anregt. KLEIN und Mitarbeiter (1982) vermuten hingegen, daß IFN von cytotoxischen T-Lymphocyten gebildet wird. Es wurde ein Zusammenhang zwischen der CTL-Aktivität und der IFN-Produktion festgestellt. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit sind beide Theorien möglich, da zur IL 2-Herstellung die Leukocytenpopulation des peripheren Blutes herangezogen wurde. Diese umfaßt sowohl Monocyten als auch Lymphocyten, wobei es sich nach neueren Erkenntnissen bei den NK-Zellen um die Vorläuferformen der Monocyten handelt (LOHMANN-MATTHES, 1981).

4.2.
Wachstumsverhalten von IL 2-abhängigen T-Zellen in Langzeitkultur

Mit dem hergestellten IL 2 sollten aktivierte T-Zellen in Langzeitkulturen erhalten werden und ihr Wachstumsverhalten beobachtet werden.
In unseren Versuchen mit Langzeitkulturen IL 2-abhängiger T-Lymphocyten und im Lymphocytenproliferationstest wurde als Ausgangskonzentration stets eine Zelldichte von 5×10^5/ml eingestellt. Nach Vorversuchen stellte sich diese Zelldichte als optimal heraus. Die Beobachtungen stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen überein (BONNARD et al., 1980; RUSCETTI und GALLO, 1981; BINDON et al., 1983), obwohl auch andere Zellkonzentrationen als optimal beschrieben wurden (BÖDEKER et al., 1982; GILLIS et al., 1982). Für das Wachstum von T-Zellen in Langzeitkultur ist ausschlaggebend, daß die Kulturen in bestimmten Abständen geteilt werden und auf die Ausgangskonzentration mit frischem IL 2-haltigem,

supplementiertem (10 % inaktives Human-Serum) Medium eingestellt werden (RUSCETTI und GALLO, 1981). Weiterhin ist das Verhältnis von Zellzahl zur IL 2-Konzentration für das Zellwachstum entscheidend (RUSCETTI et al., ROSENBERG et al., 1978).

In diesem Zusammenhang war die Austestung der optimalen IL Konzentration unbedingt erforderlich. Voraussetzung dafür war, daß das aus den Kulturüberständen weitgehend gereinigte IL 2-Medium verwendet wurde. Es konnte gezeigt werden, daß eine Zugabe von 20 % IL 2-Medium im Abstand von 3 Tagen für unsere Versuche völlig ausreichend war. Durch ungereinigte Kulturüberstände werden störende Faktoren den IL 2-abhängigen T-Zellen zugeführt, die das Wachstum der Zellen meist nachteilig beeinflussen.

Eine Hemmwirkung von hohen Dosen IL 2 wurde in diesem Zusammenhang von RUSCETTI und GALLO (1981) beschrieben, die ungereinigtes Il 2 verwendeten. Dieses Phänomen zeigte sich auch in unseren Versuchen, wo bei 50%iger Zugabe von Kulturüberständen ein kleinerer ^{3}H-Thymidineinbau als Maß für die Replikationsrate beobachtet wurde als bei einer Zugabe von 20 % (s. Tabelle 8, Abb. 3).

In den Versuchen 3.2. konnte gezeigt werden, daß die IL 2-abhängigen T-Zellen ihre Teilungsaktivität bei Fehlen von IL 2 vermindern. Die sinkende DNA-Synthese wird umso deutlicher, je höher die Repliaktionsrate der Zellen zuvor gewesen ist (Abb. 8, 3.2.). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß nach einer IL 2-Zugabe besonders zahlreich Tochterzellen von den T-Zellen gebildet wurden, die einen Rezeptor für IL 2 besitzen (hoher ^{3}H-Thymidineinbau). Der Bedarf an IL 2 steigt also proportional zum Zellwachstum. Ein Ausbleiben einer erneuten IL 2-Zugabe macht sich daher auffallend bemerkbar, da die IL 2-abhängigen T-Zellen rasch absterben. Es war also zur Erhaltung der Langzeitkulturen unbedingt erforderlich, die Zeitabstände der IL 2-Zugaben genau einzuhalten.

Voraussetzung für eine Kultivierung von IL 2-abhängigen T-Zellen war ihre Aktivierung. Es wurde versucht, durch gemischte Lymphocytenkulturen (MLC) IL 2-abhängige T-Zellen zu gewinnen (3.3.). Der Verlauf der T-Zell-Aktivierung wurde durch den Lymphocytenproliferationstest verfolgt. Die Sterblichkeitsrate der Zellen wurde durch einen Vitalitätstest ermittelt. An zwei beispielhaft verschiedenen Kulturen wurde die Aktivierung dargestellt (Abb. 9, Tabellen 12, 13).

In beiden Kulturen wurden T-Zellen aktiviert. Der Verlauf der Aktivierung war jedoch verschieden ausgeprägt. In diesem Versuch wurde damit zugleich die Problematik der Aktivierung von T-Zellen in einer MLC deutlich. In einer MLC werden 2 Zellpopulationen verschiedener Spender kokultiviert. Durch Behandlung der einen Zellpopulation mit Mitomycin C wird diese an der Transformation gehindert, wobei das Antigenmuster nicht beeinträchtigt wird. Die andere Lymphocytenpopulation reagiert auf das Antigenmuster durch Blastenzelltransformation und mitotische Teilung, die durch eine erhöhte Nucleinsäuresynthese nachweisbar ist. Diese wird anhand des Einbaus radioaktiv markierten Thymidins gemessen. Es ist daher verständlich, daß nur bei allogenen Antigenmustern die transformierende Lymphocytenpopulation aktiviert werden kann. Es findet hier in vitro also eine Reaktion statt, die in vivo eine erste Abstoßungsreaktion darstellt (FITCH und CERROTINI, 1982), die umso stärker ausgeprägt ist, je größer der Unterschied der H-Antigene ist.

Im Rahmen dieser Arbeit war es uns jedoch nicht möglich, die HLA-DR-Antigene der Spender zu bestimmen, so daß die Ergebnisse der Aktivierung im MLC unterschiedlich ausfielen.

Die hier dargelegten Zusammenhänge sind vermutlich die Ursache für unterschiedliche Reaktionen der Responder-Zellen in der MLC. Hinzu kommt, daß nach unserer Erfahrung auch die individuelle Verfassung eines jeden Spenders auf die Zellen wirken konnte,da mit ein- und denselben Spendern nicht immer reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten waren. Ausgehend von der unterschiedlichen Aktivierung der T-Zellen konnten 2 Langzeitkulturen über einen Zeitraum von 52 Tagen beobachtet werden und damit ein Beitrag zum Verhalten IL 2-abhängiger T-Zellen - ohne mitogene Verunreinigungen - in Langzeitkultur erbracht werden (3.4.). Aus den Ergebnissen geht hervor, daß das Wachstumsverhalten beider Kulturen 1 und 2 durchaus vergleichbar ist (Tab. 14, Abb. 10 - 12). Es besteht lediglich ein Unterschied in der Wachstumsrate und den damit korrellierten erreichbaren Gesamtzellzahlen. Der Wachstumsverlauf hingegen ist nahezu parallel. Beide Kulturen wurden nach 7 Tagen in einer MLC aktiviert, wobei der ^{3}H-Thymidineinbau der Kultur 2 das 2-fache der Kultur 1 betrug. Es schließt sich bei beiden Kulturen ein wechselhafter Thymidineinbau an. Über das genaue Wachstumsverhalten von IL 2-abhängigen T-Lymphocyten ist bislang noch wenig bekannt.

Der erste verminderte ^{3}H-Thymidineinbau in beiden Kulturen zwischen dem 10. und 16. Tag ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß sich tatsächlich nur noch ein Teil, der in der Gesamtkultur befindlichen Zellen vermehrt, nämlich die T-Zellen, die einen Rezeptor für IL 2 besitzen und die übrigen aus der Gesamtpopulation stammenden Zellen endgültig teilungsinaktiv sind und absterben.
Trotz der rückläufigen Teilungsrate aller in der Kultur befindlichen Zellen findet also eine relative Vermehrung der T-Suppressor-Zellen statt.
Der zweite Aktivitätspeak, der sich unmittelbar an eine IL 2-Zugabe anschließt, ist nun ausschließlich auf die T-Suppressor-Zellen zurückzuführen, verbunden mit einem Anstieg der Zelldichte. Am 25. Tag der Zellkultur treten die Zellen in ihre erste sogenannte "crisis phase" ein.
Das Sinken der Wachstumskurve nach 17 Tagen wurde ebenfalls von LINDSAY und Mitarbeitern (1982) beobachtet, die das Phänomen darauf zurückführen, daß es sich bei der Kultur um eine vollständige Zellpopulation handelt, wohingegen geklonte Zellen über mehrere Monate in Kultur gehalten werden können. Andererseits benutzte diese Arbeitsgruppe auch PHA zur Aktivierung der T-Zellen.
Nach ca. 30 - 60 Tagen wird auch von anderen Autoren beobachtet, daß die Zellen auf die Anwesenheit von IL 2 nicht mehr reagieren.
Diese Beobachtungen stimmen mit den in dieser Arbeit erhobenen Befunden überein, denn nachdem sich die Zellen beider Kulturen nach der ersten Krise kurzzeitig erholten (Anstieg des ^{3}H-Thymidineinbaus auf 16 000 - 21 000 cpm), traten sie erneut in die "crisis phase" ein, verbunden mit einer stetig sinkenden Teilungsrate und abnehmender Zellzahl. Die Ursachen für diese "crisis phase" bleiben bislang ungeklärt, mehrere Ursachen wären zu diskutieren. Da das IL 2 auf MLC oder mitogene Stimulierung hin die kontinuierliche Proliferation der Suppressor-Zellen verursacht (MACA et al., 1979), ist es möglich, daß in dem IL 2-haltigen Medium auch Zellen heranwachsen, die das Wachstum von T-Suppressor-Lymphocyten begrenzen. Dieser Mechanismus könnte eine Überwachung gegen sich rasch teilende Lymphocyten darstellen. Durch Verwendung geklonter Zellen könnte dieser Mechanismus überwunden werden. Dagegen spricht jedoch, daß in den meisten geklonten Zellinien ebenfalls begrenztes Wachstum auftritt (GRIMM und ROSENBERG, 1982).
Eventuell ist der Verlust des Wachstums während der "crisis phase" einfach nur Ausdruck der Tatsache, daß nicht maligne Zellen eine endliche Lebensdauer haben,

die auf ca. 15 Generationen begrenzt ist und die in IL 2-haltigen Zellkulturen nach ca. 30 Tagen eintritt. Da das Krisenproblem in Mäuse-Zellkulturen nicht beschrieben wird, ist es mit größter Wahrscheinlichkeit jedoch auf unzureichende Kulturbedingungen zurückzuführen oder auf andere uns bislang unbekannte Mechanismen.

Langfristig erwies sich die Vermehrung der durch eine MLC aktivierte Lymphocyten als unbefriedigend, da häufig die Aktivierung nicht ausreichte, um für unsere Versuche genügend T-Zellen anzuzüchten.

Wir gingen daher dazu über, trotz der bereits beschriebenen Nachteile des Pflanzenlektins PHA, die Zellen vergleichsweise mit diesem Lektin zu aktivieren.

Der durchschnittliche ^{3}H-Thymidineinbau nach Aktivierung mit PHA betrug 35 368 $\pm$ 8 085 cpm (n=12) gegenüber 13 892 $\pm$ 7 564 cpm (n=10) bei durch eine MLC aktivierte Lymphocyten (3.5., Abb. 13).

Die Aktivierung konnte noch verbessert werden, indem gleich zu Beginn der Aktivierung 20 % IL 2-Medium hinzugefügt wurden.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß die Aktivierung durch PHA erfolgreich war.Im folgenden wurden die T-Lymphocyten stets durch 1 % PHA und 20 % IL 2-Medium innerhalb von 5 Tagen aktiviert. Durch anschließendes Waschen der Zellen wurde überschüssiges PHA entfernt.

Da nicht davon ausgegangen werden konnte, daß jegliches PHA aus den Zellkulturen entfernt wurde, war es erforderlich nachzuprüfen, wie lange die aktivierten T-Lymphocyten durch PHA beeinflußbar waren (3.6., Tab. 14 und 16). Die dazu durchgeführten Versuche zeigten, daß nach 11 Tagen Konzentrationen von 0,25 % PHA nicht mehr auf die IL 2-abhängigen T-Lymphocyten wirkten, wobei angenommen werden kann, daß die PHA-Konzentration in den Zellkulturen nach 11 Tagen durch mehrfaches Austauschen der Kulturmedien immer weit unter diesem Wert lag.

Die PHA-Unabhängigkeit der aktivierten T-Lymphocyten am 14. Tag wurde auch von GRIMM und ROSENBERG (1982) beobachtet. Für genauere Aussagen hinsichtlich des Wachstumsverhaltens aktivierter T-Zellen wurde an 8 verschiedenen Kulturen die Teilungsaktivität durch den ^{3}H-Thymidineinbau gemessen (3.7. Abb. 17, 18), die Zellzahl und die daraus resultierende Gesamtzellzahl bestimmt. Um Aufschluß über die RNA-Synthese der aktivierten T-Zellen zu erhalten, wurde der ^{3}H-UTP-Einbau in Verbindung mit α-Amanitin gemessen (3.7., Tab. 17, Abb. 15). Die ^{3}H-Thymidineinbaurate ist ein Maß für die Replikationsrate der Zellen.

Die Teilungsaktivität war am 5. Tag in allen Zellkulturen am höchsten. Wie schon bei den durch eine MLC aktivierte T-Lymphocyten-Kultur sinkt auch hier die Teilungsaktivität nach der Aktivierungsphase zunächst ab. Erst am 8. Tag steigt sie zunächst wenig und am 12. Tag dann wieder stärker an. Nach 15 Tagen stellte sich erfahrungsgemäß die erste "crisis phase" ein, wie sie auch von LINDSAY und Mitarbeitern (1982) beschrieben wurde, wobei die Zellen verkümmerten, so daß wir uns entschieden, die täglichen Messungen nur bis zum 15. Tag durchzuführen.

Der auffallende Anstieg des ^{3}H-Thymidineinbaus (Abb. 18) in den ersten 5 Tagen der Zellkultur ist vermutlich auf die Anwesenheit von PHA zurückzuführen. Es hat einen stark aktivierenden Einfluß auf die Replikationsrate der Zellen. PHA wird übereinstimmend als das Mitogen mit der größten transformierenden Wirkung beschrieben und soll nur T-Zellen stimulieren (DEAN et al., 1975).
Das Gesamtwachstum der Zellkulturen wurde durch die täglich bestimmten Zelldichten verfolgt (3.7., Abb. 17). Zwischen je 2 IL 2-Zugaben - verbunden mit der Einstellung der Zellzahl auf die Ausgangskonzentration von $5x10^{5}$ Zellen/ml und der Erneuerung des Nährmediums hat stets eine Erhöhung der Zelldichte stattgefunden. Zwischen dem 5. und 8. Tag hat sich die Zellzahl durchschnittlich verdoppelt, in den anderen Zeitabständen fand lediglich eine Vermehrung kleineren Ausmaßes statt. Zwischen dem 14. und 15. Tag zeichnet sich bereits die eintretende "crisis phase" durch Zellverminderung ab.
Die Diskrepanz zwischen dem sinkenden ^{3}H-Thymidineinbau vom 5. - 7. Tag einerseits und der Zellverdoppelung andererseits, wie sie ähnlich auch in den durch MLC aktivierten Zellkulturen beobachtet wurden, läßt sich durch die Tatsache erklären, daß sich verschiedene Faktoren, die in diesem Abschnitt der Zellkultur wirksam sind, in ihrer Auswirkung überlagern. Zum einen muß davon ausgegangen werden, daß zwischen dem 5. und 8. Tag noch eine Gesamtpopulation von Zellen mit unterschiedlicher Lebensdauer vorliegt, kenntlich an der Zelltypisierung mit monoklonalen Antikörpern, wonach am 5. Tag 65 % und am 8. Tag 96 % der Gesamtzellen T-Zellen waren.

Ihre Lebensdauer geht in diesem Zeitraum zu Ende und es erfolgte keine DNA-Replikation mehr.
Andererseits wurden in der Aktivierungsphase mit PHA in den ersten 5 Tagen der Zellkultur die T-Suppressor-Zellen aktiviert, was sich in einer erhöhten ^{3}H-Thymidineinbaurate ausdrückt.
Diese Zellen setzten sich in der Zellkultur allmählich durch und teilen sich besonders zwischen dem 5. und 8. Tag, worauf die Zellvermehrung zurückzuführen ist. Die dazu notwendige DNA-Replikation hatte bei etlichen Zellen also schon vorher in der Aktivierungsphase stattgefunden. Die verschiedenen Ereignisse überlagern sich so, daß zwischen dem 5. und 8. Tag ein sich verringernder ^{3}H-Thymidineinbau gemessen wird, aber gleichzeitig auch eine Vermehrung der aktivierten T-Zellen zum Tragen kommt.Nach dem 8. Tag steigt der ^{3}H-Thymidineinbau allmählich an und die Zellzahl der Suppressor-Zellen erhöht sich. Parallel zu diesem Vorgang verläuft das Absterben von T-Helfer-Zellen, die keinen Rezeptor für IL 2 besitzen und von T-Suppressor-Zellen/CTL, deren Lebensdauer beendet ist. Es findet kein exponentielles Wachstum der T-Suppressor-Zellen statt, was auch durch die Zelltypisierung mit Hilfe monoklonaler Antikörper zum Ausdruck kommt, so daß daraus geschlossen werden kann, daß die Zellen eine endliche Lebensdauer haben und ihre Teilungsaktivität nachläßt. Dies wiederum würde tatsächlich dazu führen, daß die Kultivierung der Zellen begrenzt ist, wie es sich ja auch am 15. Tag bereits ankündigt. Weiterhin ist einzuräumen, daß der ^{3}H-Thymidineinbau zwar ein Maß für die DNA-Replikation ist, jedoch nicht als direktes Maß für eine gleichzeitige Zellteilung angesehen werden kann, wie auch die Ergebnisse der autoradiographischen Untersuchungen zeigten (3.10.). Hier hatten nur 10 % der Zellen einen maximalen ^{3}H-Thymidineinbau.

4.3.

RNA-Synthese von IL 2-abhängigen T-Zellen

Über die Aktivität von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen in Humanlymphocyten ist bisher relativ wenig bekannt.
Die meisten Veröffentlichungen beschreiben die Aktivität der RNA-Polymerasen ruhender Lymphocyten oder wie sie sich in den ersten 3 Tagen nach Aktivierung durch Pflanzenmitogene verhalten (POGO, 1972; COOKE und KAY, 1973; JAEHNING et al., 1975; COOPER, 1977; KESSLER-ROSBACH, 1982). In allen hierzu vorliegenden Arbeiten wird ein rapider Anstieg des ^{3}H-UTP-Einbaus auf eine erhöhte RNA-Polymerase Aktivität und damit verbundener RNA-Synthese zurückgeführt. Diese Befunde stimmen mit den Beobachtungen bei unseren Versuchen überein, wobei sich der erhöhte ^{3}H-UTP-Einbau über 15 Tage in der Zellkultur fortsetzt.
Die 15-Tage-Zellkultur kann in 4 Intervalle eingeteilt werden; das erste Intervall bezeichnet die Aktivierungsphase, in der die Leukocyten durch PHA aktiviert werden. Die folgenden Intervalle sind stets die Zeitabschnitte zwischen 2 IL 2-Zugaben. Es konnte hier beobachtet werden, daß im 2. und 3. Intervall stets 1 Tag nach der IL 2-Zugabe der ^{3}H-UTP-Einbau am höchsten war. Erst im letzten Intervall steigt der UTP-Einbau stetig an. Die UTP-Einbauraten weisen am 14. und 15. Tag der Zellkultur besonders hohe Werte auf.
Desweiteren fällt auf, daß eine Hemmung der RNA-Polymerase II durch α-Amanitin oft nicht erkennbar wurde. Anstelle eines verminderten ^{3}H-UTP-Einbaus stiegen hier die Werte höher, als die Kontrollwerte ohne α-Amanitin.
In der Literatur gibt es bislang nur wenige Hinweise, die dieses Phänomen ebenfalls beschreiben. KESSLER-ROSBACH (1982) beobachtete es teilweise bei - durch Lektine aktivierte - humanen Lymphocyten. Die Arbeitsgruppe von LEBEDEVA und PLATONOV (1980) beschreibt eine Aktivierung der RNA-Polymerasen durch α-Amanitin an isolierten Zellkernen hepatektomierter Rattenleberzellen. Als Erklärung für diese Erscheinung wäre dankbar , daß das α-Amanitin den Elongationsschritt der Transkription durch direkte Interaktionen mit RNA-Polymerasen blockiert (MANDEL und CHAMBON, 1971; COCHET-MEILHAC und CHAMBON, 1974).

Ein erhöhter ^{3}H-UTP-Verbrauch bei 1 µg Amanitin/ml weist auf eine Aktivierung der RNA-Polymerase hin bzw. eine meßbare Erhöhung der Nucleinsäuresynthese. In diesem Fall wird die Elongation der Transkription offensichtlich nicht blockiert, sondern im Gegenteil - aufrecht erhalten. Eine direkte Interaktion des α-Amanitins mit der RNA-Polymerase scheint dann durch bislang unbekannte Mechanismen verhindert zu werden. Durch die Beeinflussung des α-Amanitins auf die RNA-Polymerasen wird allerdings die tatsächliche Aktivität der RNA-Polymerasen verdeckt. Prinzipiell ist die Interpretation der Experimente mit intakten Zellen jedoch kompliziert, da die Zellen nicht frei permeabel für α-Amanitin sind. Außer langen Einwirkzeiten für das α-Amanitin sind sekundäre Nebenwirkungen durch dieses Toxin intrazellulär denkbar (ROEDER, 1976). Das Verhältnis der 3 RNA-Polymerase-Klassen zueinander, konnte zwischen dem 4. und 15. Tag bei einigen Kulturen bestimmt werden. Den Hauptanteil tragen dabei stets die RNA-Polymerasen I und III. Ein Anstieg dieser beiden RNA-Polymerasen in den ersten 3 Tagen einer Aktivierung wurde von anderen Autoren bereits eingehend untersucht. Die Syntheseraten der hn-RNA stiegen dabei nur relativ gering (JAEHNING et al., 1975; KESSLER-ROSBACH, 1982).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß vorwiegend die RNA-Polymerase III bis zum 13. Tag eine hohe RNA-Syntheseleistung zeigt. Die RNA-Polymerase III katalysiert die kleinen Nucleinsäuren, die 4,5 S t-RNA und die 5S r-RNA (ROEDER, 1976).

Aus den Ergebnissen wird sichtbar, daß unter IL 2 Einfluß wachsende T-Zellen eine erhöhte Ribonucleinsäuresynthese aufweisen, wobei der Hauptanteil auf die t-RNA-Synthese entfällt. Eine Umkehrung der Verhältnisse tritt am Tag der letzten IL 2-Zugabe ein. Die Syntheseleistung der RNA-Polymerase I steigt enorm an. Es wird hier nun vermehrt r-RNA gebildet.

Den Grund für den steigenden ^{3}H-UTP-Einbau und die damit erhöhte RNA-Synthese, insbesondere t-RNA, könnte darin gesehen werden, daß eine hohe Proteinsynthese stattfindet, die nicht nur der Zellteilung dient, sondern auch der Differenzierung zu Effektor-Zellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen durch den Nachweis, daß sich in der Zellkultur die T-Suppressor-Zellen/CTL vermehrten, darauf hin.

Der extrem hohe ^{3}H-UTP-Einbau am 13. - 15. Tag ist in erster Linie auf T-Suppressor-Zellen zurückzuführen, die zu diesem Zeitpunkt 70 - 80 % einer Zellkultur ausmachen. Diese Zellen zeichneten sich auch dadurch aus, daß sie zu lymphoblastischen Zellen heranwuchsen, d. h. sie vergrößerten sich und insbesondere das Cytoplasma. Weiterhin findet in dieser Zeit (13 - 15 Tage) neben dem Substanzwachstum gleichzeitig ein Anstieg der Zellzahl statt. Zur selben Zeit ist die Transcriptionsrate jedoch wesentlich höher als die Teilungsrate. Die gebildete RNA hat eventuell auch eine Proteinsynthese zur Folge, die neben dem Substanzwachstum T-Suppressor-Zell spezifisch Proteine bildet.
Von den T-Suppressor-Zellen wird beschrieben, daß sie Perforine bilden können, T-Suppressor-Zell-spezifische Proteine, die in die Membran als fremd erkannter Zellen eingelagert werden und diese daraufhin "perforieren" (PODACK und KONIGSBERG, 1984).
Um die RNA-Polymerasen getrennt voneinander nachzuweisen, wurden IL 2-abhängige T-Zellen in einer bestimmten Konzentration angezüchtet, um daraus die RNA-Polymerasen zu isolieren und ihre Aktivität in einem spezifischen Enzymtest nachzuweisen. Da problematisch war, für jeden Tag der Zellkultur geeignete Mengen T-Lymphocyten anzuzüchten, entschieden wir uns, lediglich am 13. und am 15. Tag der Zellkultur die Zellen zu präparieren.
Um einen Vergleich der RNA-Polymerasen der Zellen in diesem Zeitraum mit RNA-Polymerasen von Zellen aus der "crisis phase" zu haben, wurde eine Kultur 21 Tage erhalten und ihre Zellen am 21. Tag aufgearbeitet.
Bei den nach unserer Methode isolierten RNA-Polymerasen handelt es sich um die "solubilisierte" Form. In der Literatur wird des öfteren eine Einteilung in "freie" und "gebundene" RNA-Polymerasen vorgenommen.
Bei der "freien" RNA-Polymerase handelt es sich um das Enzym, dem im Enzymtest ein Template geboten werden muß. Die wahrscheinlich aktive Form ist die an Chromatin gebundene RNA-Polymerase (AUSTOKER et al., 1974; LIN et al.; 1976; TILLYER und BUTTERWORTH, 1978; RAUL und V.D. DECKEN, 1983).
Es besteht jedoch bei der Isolierung der RNA-Polymerasen die Gefahr, daß das freie Enzym verlorengeht. Ein weiteres Problem bei der Kernisolierung stellte auch der Zustand der T-Lymphocyten dar. Diese waren lympho-

blastische Zellen mit stark vergrößertem Cytoplasma. Die Zellen waren sehr empfindlich und platzten durch mechanische Einwirkungen leicht auf. Die nach der Kernisolierung weiterführende Isolierung der RNA-Polymerasen wurde in 3 Zellfraktionen eingeteilt:

a) eine Cytoplasmafraktion, die bei der Lymphocyten-Kernpräparation das frei werdende Cytoplasma zerstörter Zellen enthält (2.9.1.),
b) eine Kernplasmafraktion, wobei es sich um die frei im Kernplasma vorkommende RNA-Polymerase handelte,
c) die DNA-Fraktion, die DNA-gebundene RNA-Polymerase enthielt.

Durch die Aufbereitungsmethode wurden die intrazellulären RNA-Polymerasen solubilisiert, von den endogenen Templates getrennt und chromatographisch aufgetrennt. In Gegenwart von exogenen, nicht-spezifischen Templates (Poly d (AT)·d (AT)) wurde ihre Aktivität getestet.
Es wird angenommen, daß diese Aktivität unter den genannten Bedingungen der RNA-Polymerase-Konzentration entspricht (ROEDER, 1976). In allen Zellfraktionen konnten die RNA-Polymerasen nachgewiesen werden. In den Zellfraktionen des 13. Tages war die RNA-Polymerase III - und in den Zellfraktionen des 15. Tages die RNA-Polymerase I erhöht, jedoch nicht in dem Maße, wie es bei intakten Zellen gefunden wurde.
Das Aktivitätsverhältnis der RNA-Polymerasen, wie zuvor an intakten Zellen ermittelt, konnte mit den "solubilisierten" RNA-Polymerasen im Enzymtest nicht dargestellt werden. Differenzen zwischen der Aktivität der RNA-Polymerasen in intakten Zellen und der Aktivität nach Solubilisierung im Enzymtest wurde auch von Autoren beschrieben, die andere aktivierte Zellen untersuchten, Ratten-Uterus-Zellen (COURVALIN et al., 1976); Fibroblasten, (MAUCK, 1977) und Epidermiszellen, (KATULA et al., 1981). BLAIR (1979), der Leberzellen von Mäusen untersuchte, führt die Aktivitätsverluste nur auf die vielen Vorgänge zur Isolierung der RNA-Polymerasen zurück. Das würde bedeuten, daß die beobachtete Transcriptionsrate der RNA-Polymerase nach 13 und 15 Tagen Zellkultur auf einer gesteigerten RNA-Polymerase-Konzentration beruht, die sich durch die Manipulation bei der Aufarbeitung verringerte. Es sind jedoch weitere Möglichkeiten denkbar, die die ver-

ringerte Aktivität der solubilisierenden RNA-Polymerasen im Enzymtest erklären, in dem die erhöhte RNA-Polymerase-Aktivität nicht konzentrationsabhängig ist:

- zum einen ist möglich, daß die Verfügbarkeit des Genoms für die Transcription ansteigt, insbesondere für die t-RNA und 5S r-RNA, indem vermehrt Initiationsstellen auf der DNA zugänglich sind, oder die Elongation beeinflußt wird,
- die Aktivität der bereits existierenden RNA-Polymerasen steigt durch die Bildung von Effektormolekülen an. In diesem Fall treten Veränderungen am Enzym selbst ein.

Für diese beiden Möglichkeiten spricht, daß bei einer höheren Proteinkonzentration in den Zellfraktionen die Enzymeinheiten nicht erhöht sind. Es ist nicht auszuschließen, daß die Aktivität der RNA-Polymerasen in den IL 2-abhängigen T-Lymphocyten durch mehrere Mechanismen reguliert wird.
Insgesamt gesehen scheint es, daß alle Ursachen, die zu der Aktivitätssteigerung der RNA-Polymerasen führen, einen langfristig angepaßten Wechsel der T-Zellen wiederspiegeln und daß andere Faktorer nicht ausgeschlossen werden können, die die Aktivierung der RNA-Polymerasen oder ihre Selektivität regulieren (ROEDER, 1976).

Zusammenfassend läßt sich zu den dargelegten Ergebnissen sagen, daß eine Aussage über die Aktivitätsverteilung der RNA-Polymerasen nach "Solubilisierung" und Auftrennung durch Chromatographie recht schwierig ist. Die RNA-Polymerasen aus Zellen der 13- und 15-Tage-Zellkulturen, die von uns untersucht wurden, bestätigen, daß durch Chromatographie die Aktivität der einzelnen RNA-Polymerasen nachweisbar ist, aber eine Zuordnung, wie nach dem α-Amanitin-Versuch an intakten Zellen errechnet, nur bedingt möglich ist.
Die Autoradiographie, die stets im Parallelversuch mit Messungen im Scintillationszähler durchgeführt wurde, zeigt, daß ca. 10 % aller zu einem Test verwendeten Zellen einen deutlichen Einbau von ^{3}H-Thymidin aufweisen.
Bei der Auswertung der Scintillationsmessung mit ^{3}H-UTP inkubierten Zellen ergaben sich vergleichbare Ergebnisse. Besonders bei hohen Einbauraten($\geq$ 30 000 cpm) zeigten ca. 10 % der Zellen mehr als 200 grains. Der übrige Teil (ca. 90 %) der Zellen war relativ inaktiv. Alle Aussagen

über einen ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA und ^{3}H-UTP-Einbau in die RNA beziehen sich infolgedessen auf nur 1/10 oder weniger der Zellen. Die Erhöhungen der Einbauraten von sowohl UTP als auch Thymidin wird nach den Ergebnissen der Autoradiographie nicht durch eine vermehrte Zellzahl erreicht, sondern durch eine Steigerung der Nucleinsäuresynthese pro Zelle.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde mitogenfreies Interleukin 2 (IL 2) hergestellt, da Mitogene ihrerseits T-Lymphocyten beeinflussen und die Wirkung von IL 2 "maskieren" können. Zur IL 2-Herstellung dienten Lymphocyten aus Humanblut, die durch Neuraminidase-Galactoseoxidase zur IL 2-Ausschüttung angeregt wurden. Eine sukzessive Aufarbeitung der IL 2-haltigen Kulturmedien erbrachte nach Gelfiltration (AcA 54 Gel) weitgehend gereinigtes IL 2.

2. Der Nachweis von IL 2 wurde durch einen Lymphocytenproliferationstest erbracht.

3. Das IL 2 hatte nach Gelfiltration ein Molekulargewicht zwischen 15 000 und 20 000. Durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde für IL 2 ein Molekulargewicht von 17 000 bestimmt.

4. Das bei der IL 2-Herstellung ebenfalls gebildete Interferon konnte durch die CPE-Reading-Methode nachgewiesen werden. Nach Gelfiltration wurde ein Molekulargewicht von 20 000 bis 30 000 und nach PAGE ein Molekulargewicht von 24 000 bestimmt.

5. Nach Austestung verschiedener IL 2-haltiger Proben wurde entschieden, den Pool der IL 2-haltigen Fraktionen nach Gelfiltration ($\hat{=}$ IL 2-Medium) in einer Konzentration von 20 % zur Anreicherung der T-Lymphocyten in Zellkultur zu verwenden. Es konnte gezeigt werden, daß ein Ausbleiben der regelmäßigen IL 2-Zufuhr zum Absterben der IL 2-abhängigen T-Zellen führte.

6. MLC-aktivierte T-Lymphocyten wurden in 2 verschiedenen Kulturen über einen Zeitraum von 52 Tagen unter Zugabe von IL 2 erhalten. Als Kontrollparameter der Teilungsaktivität der T-Zellen diente der ^{3}H-Thymidineinbau in die DNA. Die Zellen vermehrten sich innerhalb der Kulturdauer um das 5- bzw. 9-fache, traten aber innerhalb der Kulturdauer in eine mehrtägige Ruhephase und nach dem 40. Tag in die sog. "crisis phase" ein, in der die Zellen trotz IL 2-Zugaben abstarben.

Die Gründe hierfür sind nicht bekannt.

7. Vergleichend wurden IL 2-abhängige T-Zellen mit 1 % PHA aktiviert und unter regelmäßigen IL 2-Zugaben in Zellkultur 15 Tage erhalten. Es zeigte sich ein analoges Verhalten zu den durch MLC aktivierten Kulturen, allerdings war die Gesamtzellzahl nach 15 Tagen höher.

8. Um erstmalig auch das Verhalten der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen der IL 2-abhängigen T-Zellen in diesen Kulturen zu untersuchen, wurden die RNA-Polymerasen täglich durch α-Amanitin spezifisch gehemmt und der ^{3}H-UTP-Einbau gemessen. Die unter IL 2-Einfluß wachsenden T-Zellen hatten einen ansteigenden ^{3}H-UTP-Einbau, der in den letzten 3 Tagen der Zellkultur auffallend hohe Werte erreichte (20 000 bis 60 000 cpm). Den Hauptanteil der Gesamtaktivität aller 3 RNA-Polymerase-Klassen trug bis zum 13. Tag die RNA-Polymerase III (t-RNA, 5S r-RNA), am 14. und 15. Tag dominierte die RNA-Polymerase I (r-RNA).

9. Ergänzend dazu wurden die RNA-Polymerasen IL 2-abhängiger T-Lymphocyten einer 13, 15 und 21 Tage alten Kultur isoliert und durch DEAE-Sephadex Chromatographie voneinander getrennt (solubilisiert). Die nach dem α-Amanitin Versuch in intakten Zellen erhöhte Aktivität der RNA-Polymerase III (13. Tag) und -I (15. Tag) ließ sich auch hier nachweisen, jedoch war ihre Aktivität quantitativ nur wenig unterschiedlich zu den beiden übrigen RNA-Polymerasen. Somit ließ sich das im α-Amanitin-Versuch gefundene Aktivitätsverhältnis der RNA-Polymerasen im Enzymtest mit solubilisierten RNA-Polymerasen nicht aufrecht erhalten.

10. Durch die Anwendung FITC-konjugierter monoklonaler Antikörper konnte gezeigt werden, daß die Zellkultur nach 9 Tagen bereits zu 97 % aus T-Zellen bestand. Dabei stieg anteilig die Zahl der T-Suppressor-Zellen auf annähernd 80 % am 15. Tag. Die Zahl der T-Helfer-Zellen nahm kontinuierlich ab und erreichte am 15. Tag ca. 20 %.

11. Durch Autoradiographie wurde untersucht, wie der Einbau von ^{3}H-Thymidin und ^{3}H-UTP auf die Gesamtzellen verteilt ist. Es wurden Zellen nach 13 und 15 Tagen Zellkultur untersucht. Der im Scintillationszähler meßbare Einbau wird nur von einem kleinen Teil, ca. 10 % der Zellen eines Ansatzes eingebaut, während der übrige Teil der Zellen eine geringe Nucleinsäuresynthese hat.

Durch die Anwendung von Interleukin 2 war es möglich, aktivierte T-Lymphocyten in Langzeitkulturen in ihrem Wachstumsverhalten zu charakterisieren. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß durch den Einfluß von IL 2 die RNA-Synthese anstieg und dabei die Aktivität der RNA-Polymerase III dominierend war.

6. LITERATURVERZEICHNIS

AARDEN, L.A.:

Revised Nomenclature for Antigen-non-specific T Cell Proliferation and Helper Factors.
J. Imm., 123: 2928-2929 (1979)

ALOCER-VARELA, J.D.; D. ALARCON-SEGOVIA:

Decreased Production of and Response to Interleukin-2 by Cultured Lymphocytes from Patients with Systemic Lupus Erythematosus.
J. Clin., Invest. 69: 1388-1392 (1982)

ALVAREZ, J.M.; M.O. DE LANDAZURI; G.D. BONNARD und R.B. HERBERMAN:

Cytotoxic Activities of Normal Cultured Human T Cells.
J. Imm., 121: 1270-1273 (1978)

ALVAREZ, J.M.; A. SILVA; M.O. DE LANDAZURA:

Human T Cell Growth Factor. I. Optimal Conditions for its Production.
J. Imm., 123: 977-983 (1979)

AUSTOKER, J.L.; T.J.C. BEEBEE; C.J. CHESTERTON und P.H.W. BUTTERWORTH:

DNA-dependent RNA-Polymerase Activity of Chinese Hamster Kidney Cells Sensitive to High Concentrations of α-Amanitin.
Cell, 3: 227-234 (1974)

BACH, F.H.; M. SEGALL; K. STROUBER-ZIER; M. SONDEL und B.J. ALTER:

Cell-mediated Immunity: Seperation of Cells Involved in Recognitive and Destructive Phases.
Science, 180: 403-406 (1973)

BINDON, C.; M. CZERNIECKI; P. RUELL; A. EDWARDS; W. H. Mc CARTHY; R. HARRIS und P. HERSEY:

Clearance Rates and Systemic Effects of Intravenously Administered Interleukin 2 (IL 2) Containing Preparations in Human Subjects.
Br. J. Cancer, 47: 123-133 (1983)

BLAIR, D. G. R.:

Comparison of the Activity of Nuclear DNA-Dependent RNA-Polymerases Isolated from Li vers of Several Strains of Mice.
Int. J. Biochem., 10: 713-721 (1979)

BÖDEKER, B.D.G.; C. KORTMANN; H.H. PETER; W.J. PICHLER und P.F. MÜHLRADT:

Interleukin-2 in the Ontogeny of Human Lymphoid Tissues.
Immunbiol., 162:, 66-77 (1982)

BÖDEKER, B.G.D.; J. LEHMANN; P.F. MÜHLRADT:

Lymphokine (Interleukin-2) Production by Mitogen-Stimulated Human Lymphocytes in Small Reactors.
Joint ESACT/IABS Meeting, Develop. Biol. Standard, 193-200 (1982)

BONNARD, G.D.; J.M. ALVAREZ:

Production and Action of Human Interleukin 2. Conditions and Cellular Requirement for the Production of Human Interleukin 2. A Review.
Behring-Inst. Mitt., 67: 230-234 (1980)

BONNARD, G.D.; K. YASAKA; R.D. MACA:

Continued Growth of Functional Human T Lymphocytes: Production of Human T-Cell Growth Factor.
Cell. Imm., 51: 390-401 (1980)

BULL, P.; J. GARRIDO:

Structure of Yeast RNA Polymerases Determined by Elektron Microscopy.
Arch. Biochem. Biophys., 219: 163-166 (1982)

COCHET-MEILHAC, M.; P. CHAMBON:

Animal DNA-dependent RNA-Polymerases.
11. Mechanism of the Inhibition of RNA Polymerases B by Amatoxins.
Biochim. Biophys. Acta, 353: 160-184 (1974)

COOKE, A.; J.E. KAY:

Effect of Phytohaemagglutinin on the Nuclear RNA Polymerase Activity of Human Lymphocytes.
Exp. Cell. Res., 79: 179-185 (1973)

COOPER, H.L.:

Ribosome Utilization and Regulation of Protein Synthesis during Lymphocyte Activation.
In: Regulatory Mechanisms in Lymphocyte Activation (Ed.: D.O. Lucas).
Acad. Press., Inc ., N.Y., 94-113 (1977)

COURVALIN, J.-C.; M.-M. BOUTON; E.-E. BAULEN; P. NURET und P. CHAMBON:

Effect of Estradiol on Rat-Uterus DNA-Dependent RNA-Polymerases.
J. Biol. Chem., 251: 4843-4849 (1976)

DEAN, J.H.; J.S. SILVA; C.M. LEONARD; J.L. Mc COY; G.B. CANNON und R.B. HERBERMANN:

Functional Activities of Rosette Seperated Human Peripheral Blood Leukocytes.
J. Imm., 115: 1449-1455 (1975)

ESEN, A.:

A simple Method for Quantitative, Semiquantitative and Qualitative Assay of Protein.
Analyt. Biochem. 138: 264-267 (1978)

FABRICIUS, H.A.; E: KOTTGEN; R. STAHN; S. MACKE und B. OSSWALD:

The Role of Serum Proteins in PHA-induced Production of Interleukin 2 by Human Peripheral Blood Lymphocytes.
Behring Inst. Mitt., 67: 249-255 (1980)

FALCK-PEDERSEN, E.; P.W. MORRIS; D.L. VENTON:

Regiospecific Arylazo Substitution into α-Amanitin with Retention of Inhibitory Properties against Eucaryotic Class II RNA Polymerase.
Int. J. Peptide Protein Res., 21: 431-439 (1983)

FARRAR, J.J.; S.B. MIZEL; M.L. HILFIKER; J.W. SCOTT; S.A. ROTHMANN und R.N. MOORE:

Macrophage Independent Activation of T Helper Cells.
I. Production of Interleukin-2.
J. Imm., 125: 793-798 (1980)

FARRAR, W.L.; H.M. JOHNSON und J.J. FARRAR:

Regulation of the Production of Immune Interferon and Cytotoxic T Lymphocytes by Interleukin 2.
J. Imm., 126: 1120-1125 (1981)

FITCH, F.W.; J. C. CEROTTINI:

Isolation, Characterization and Utilization of T-Lymphocyte Clones.
I. Introduction and Historical Overview.
In: Isolation, Characterization and Utilization of T-Lymphocyte Clones.
(Eds.: C.J. Fathman, F.W. Fitch).
Acad. Press, Inc., N.Y., 1-9 (1982)

GERY; I.; R.K. GERSHON; B.H. WAKSMAN:

Potentiation of the Thymocyte Response to Mitogens.
I. The Responding Cell.
J. Exp. Med., 136: 128-138 (1972)

GILLIS, S.; K.S. SMITH:

Long-Term Culture of Tumor-Specific Cytotoxic T-Cells.
Nature, 268: 154-155 (1977)

GILLIS, S.; P.E. BAKER; F.W. RUSCETTI und K.A. SMITH:

Long-Term Culture of Human Antigen-Specific Cytotoxic T-Cell Lines.
J. Exp. Med., 148: 1093-1098 (1978)

GILLIS, S.; K.A. SMITH; J. WATSON:

Biochemical Characterization of Lymphocyte Regulatory Molecules.
J. Imm., 124: 1954 - 1960 (1980)

GILLIS, S.; A.E. GILLIS; C.S. HENNEY:

Monoclonal Antibody Directed against Interleukin 2. I. Inhibition of T Lymphocyte Mitogenesis and the in Vitro Differentiation of Alloreactive Cytolytic T Cells.
J. Exp. Med., 154: 983-989 (1981)

GILLIS, S.; M.A. MERTELSMANN; S. MOORE:

T-Cell Growth Factor (Interleukin 2) Control of T-Lymphocyte Proliferation: Possible Involvement in Leukemogenesis.
Transplant. Proc., 13: No. 4, 1884-1893 (1981)

GILLIS, S.; D.Y. MOCHIZUKI; P.J. CONLON; S.H. HEFENEIDER; C.A. RAMTHUN; A.E. GILLIS; M.B. FRANK; C.S. HENNEY und J.D. WATSON:

Molecular Characterization of Interleukin 2.
Imm. Rev., 63: 167-209 (1982)

GILLIS, S.; J. WATSON; D. MOCHIZUKI:

Purification and Characterization of IL 2.
In: Isolation, Characterization and Utilization of T Lymphocyte Clones.
(Eds.: C.G. Fathman, F.W. Fitch)
(Acad. Press, Inc., N.Y., 503-507 (1982)

GRAEVES, M.F.; S. BAUMINGER; G. JANOSSY:

Lymphocyte Activation:
II Binding Sites for Phytomitogenes on Lymphocyte Subpopulations.
Clin. Exp. Immunol., 10: 537-542 (1972)

GRIMM, E.A.; S.A. ROSENBERG:

Production and Properties of Human IL-2.
In: Isolation, Characterization und Utilization of T Lymphocyte Clones.
(Eds.: C.G. Fathman, F.W. Fitch)
Acad. Press, Inc., N.Y., 57-82 (1982)

HAHN, H.:

Phytohormonwirkung und RNA-Polymerasen-Charakterisierung eines Transcriptionssystems aus Weizenembryonen und Achlya.
Habilitationsschrift, Bonn (1979)

HANDA, K.; R. SUZUKI; H. MATSUI; Y. SHIMIZU und K. KUMAGAI:

Natural Killer (NK) Cells are Responsible to Interleukin 2 (IL 2).
II. IL 2-induced Interferon Production.
J. Imm., 130: 988-992 (1983)

HURWITZ, J.; A. BRESLER; R. DIRINGER:

The Enzymatic Incorporation of Ribonucleotides into Polyribonucleotides and the Effect of DNA.
BBRC, 3: 15-21 (1960)

JAEHNING, J.A.; C.C. STEWART; R.G. ROEDER:

DNA Dependent RNA Polymerase Levels during the Response of Human Peripheral Lymphocytes to Phytohaemagglutinin.
Cell., 4: 51-57 (1975)

JENDRISAK, J.J.; P.W. PETRANYI; R.R. BURGESS:

Wheat Germ DNA-dependent RNA Polymerase II: Purification and Properties.
In: RNA-Polymerases
(Eds.: R. Losick; M. Chamberlin)
Cold Spring Harbor Lab., 136-153 (1976)

JOHNSON, H.M.; B.A. TORRES:

Phorbol Ester Replacement of Helper Cell and Interleukin 2 Requirements in Gamma Interferon Production.
Inf. Immunity, 36: 911-914 (1982)

JOHNSON, H.M.; W.L. FARRAR:

The Role of a Gamma Interferon-Like Lymphokine in the Activation of T Cell for Expression of Interleukin 2 Receptors.
Cellular Immunol., 75: 154-158 (1983)

KAIEDA, T.; M. OKADA; N. YOSHIMURA; S. KISHOMOTO; Y. YAMAMURA und T. KISHI MOTO:

A Human Helper T-Cell Clone Secreting both Killer Helper Factor(s) and T-Cell-Replacing Factor(s).
J. Imm., 129: 46-50 (1982)

KASAKURA, S.:

Cytotoxic Lymphocytes Induced by Soluble Factors Derived from the Medium of Leukocyte Cultures.
J. Imm., 118: 43-47 (1977)

KATULA, K.S.; L.I. GIEBERT; S. SRIDHARA:

DNA-dependent RNA Polymerase Activity in Silkmoth-Wing Epidermis after Hormone Treatment.
Mol. Cell. Endocrinol., 22: 315-328 (1981)

KAWAHATA, R.T.; L.F. CHUANG; C.A. HOLMBERG; B.I. OSBURN und R.Y. CHUANG:

Inhibition of Human Lymphoma DNA-dependent RNA Polymerase Activity by 6-Mercaptopurine Ribonucleoside Triphosphate.
Cancer Res., 43: 3655-3659 (1983)

KELLER, R.:

Immunologie und Immunpathologie
Thieme-Verlag, 75-76 (1981)

KESSLER-ROSBACH, B.:

Die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen in isolierten humanen Lymphocytenkernen nach Mitogenstimulierung.
Dissertation, Bonn (1982)

KLEIN, J.R.; D.H. RAULET; M.S. PASTERNAK und M.J. BEVAN:

Cytotoxic T Lymphocytes Produce Immune Interferon in Response to Antigen or Mitogen.
J. Exp. Med., 155: 1198-1203 (1982)

KÖSSEL, H.:

Signal-Strukturen der Genexpression.
Biuz. 12: 39-48 (1982)

LEBEDEVA, L.M.; O.M. PLATONOV:

Some Factores of Nuclear Genome Transcription at Early Stages of Liver Regeneration. RNA-Polymerase Activity of Isolated Nuclei.
Biochemie (Moskau), 45: 5 (1980)

LIN, Y.-CH.; K.M. ROSE; S.T. JACOB:

Evidence for the Nuclear Origin of RNA Polymerases Identified in the Cytosol: Release of Enzymes from the Nuclei Isolated in Isotonic Sucrose.
BBRC, 72: 114-120 (1976)

LINDSAY, P.; U. SCHWULERA; H.S. SONNEBORN:

The Species Specifity of Interleukin 2.
Human Lymphokines, IV. Mechanisms of Action in Vitro and Animal Models,
Res. Dep. BIOTEST. Serum Inst. F.R.G., GmbH, 479-485 (1982)

LIS, M.; N. SHARON:

The Biochemistry of Plant Lectins (Phytohaemagglutinis).
Ann. Rev. Biochem., 42: 541-588 (1973)

LOHMANN-MATTHES, M.L.:

Der Macrophage.
Biuz., 11: 135-143 (1981)

LOTZE, M.; S.A. ROSENBERG:

In Vitro Growth of Cytotoxic Human Lymphocytes. III. The Preparation of Lectin-Free T Cell Growth Factor (TCGF) and an Analysis of its Activity.
J. Imm., 126: 2215-2220 (1981)

MACA, R.D.; BONNARD, G.D.; R. HERBERMANN:

The Supression of Mitogen and Alloantigen-stimulated Peripheral Blood Lymphocyte by Cultured Human T Lymphocytes.
J. Imm. 125: 246-250 (1979)

MANDEL, J.L.; P. CHAMBON:

Purification of RNA-Polymerase B Activity from Rat Liver.
FEBS Lett., 15: 181-185 (1971)

MAUCK, J. C.:

Solubilized DNA-Dependent RNA-Polymerase Activities in Resting and Growing Fibroblast.
Biochem., 16: 793-797 (1977)

MIER, J.W.; R.C. GALLO:

Purification and some Characteristics of Human T-Cell Growth Factor from Phytohaemagglutinin-stimulated Lymphocyte Conditional Media.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77: 6134-6138 (1980)

MORGAN, D.A.; F.W. RUSCETTI; R. GALLO:

Selective in Vitro Growth of T Lymphocytes from Normal Human Bone Marrows.
Science, 193: 1007-1012 (1976)

NEEFE, J.R.; G.R. CURL; J.N. WOODY:

Absolute Requirement for Adherent Cells in the Production of Human Interleukin 2 (IL 2).
Cell. Immunol., 63: 71-80 (1981)

NOVOGRODSKY, A.; M: SUTHANTHIRAN; B. SALTZ; D: NEWMAN; A.L. RUBIN und K.H. STENZEL:

Generation of a Lymphocyte Growth Factor by Treatment of Human Cells with Neuraminidase and Galactose Oxidase.
J. Exp. Med., 151: 755-760 (1980)

OKADA, M.; C.S. HENNEY:

The Differentiation of Cytotoxic T Cells in Vitro. II. Amplifying Factor(s) Produced in Primary Mixed Lymphocyte Cultures against K/D Stimuli Require the Presence of Lyt 2^+ Cells but not Lyt 1^+ Cells.
J. Imm., 125: 300-307 (1980)

OPPENHEIM, J.J.; B.M. STADLER; R.P. SIRAGANIAN; M. MAGE und B. MATHIESON:

Lymphokines: Their Role in Lymphocyte Responses. Properties of Interleukin 1.
Minisymposium, presented by the American Association of Immunologists, 65^{th} Ann. Meet. FASEB (1981)

PALACIOS, R.:

Mechanism of T Cell Activation: Role and Functional Relationship of HLA-DR Antigens and Interleukins.
Imm. Rev., 63: 73-110 (1982)

PAULY; J.L.; C.W. RUSSEL; J.A. PANINSEK und J. MINOWADA:

Studies of Cultured Human T-Lymphocytes. I. Production of the T Cell Growth-promoting Lymphokine Interleukin 2.
J. Imm. Methods, 50: 173-186 (1982)

PAWELEC, G.; A. BOROWITZ; P.H. KRAMMER und P. WERNET:

Constitutive Interleukin 2 Production by the JURKAT Human Leukemic T Cell Line.
Eur. J. Immunol., 12: 387-392 (1982)

PODACK, E.R. und P.J. KONIGSBERG:

Cytolytic T Cell Granules
Isolation, Structural, Biochemical, and
Functional Characterization
J. Exp. Med., 160: 695 - 703 (1984)

POGO, B.G.T.:

Early Events in Lymphocyte Transformation
by Phytoheamagglutinin-DNA-dependent RNA
Polymerase Activities in Activated Lympho-
cyte Nuclei.
J. Cell Biol., 53: 633-641 (1972)

POPOVIČ, M.; M.G. SARANGADHARAN; E. READ und R.C. GALLO:

Detection, Isolation and Continuous Production
of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from
Patients with AIDS and pre-AIDS.
Science, 224: 497-500 (1984)

RAUL, F.; A. VON DER DECKEN:

Modulation of RNA Polymerase Activities
in the Intestine of Adult Rats by Dietary
Sucrose.
J. Nutr., 113: 2034-2040 (1983)

RHEINBABEN, F. VON:

Interferonbestimmung in Seren von Cervix-
Carcinom-Patientinnen (Verlaufsbeobachtungen
nach Strahlentherapie).
Diplomarbeit, Bonn (1980)

ROBB, R.J.; K.A. SMITH:

Heterogeneity of Human T Cell Growth
Factor(s) Due to Variable Glycosylation.
Mol. Immunol., 18: 1087-1092 (1981)

ROBB, R.J.:

Human T-Cell Growth-Factor: Purification,
Biochemical Characterization and Interaction
with a Cellular Receptor.
Immunbiol., 161: 21-50 (1982)

ROEDER, R.G.:

Eukaryotic Nuclear RNA Polymerases.
In: RNA Polymerase
(Eds.: R. Losick, M. Chamberlin) Cold Spring
Harbor Lab., 285-329 (1976)

RUSCETTI, F.W.; D.A. MORGAN; R.C. GALLO:

Functional and Morphological Characterization of Human T Cells Continuously grown in Vitro. J. Imm., 119: 131-138 (1977)

RUSCETTI, F.W.; R.C. GALLO:

Human T-Lymphocyte Growth Factor. Regulation of Growth and Function of T Lymphocytes.
Blood, 57: 379-394 (1981)

RYSER, J.E.; J.C. CEROTTINI; K.T. BRUNNER:

Generation of Cytolytic T Lymphocytes in Vitro. IX. Induction of Secondary CTL Responses in Primary Long-term MLC by Supernatants from Secondary MLC.
J. Imm., 120: 370-377 (1978)

SEIFART, K.H.; C.E. SEKERIS:

α-Amanitin, a Specific Inhibitor of Transcription by Mammalia RNA-Polymerase.
Z. Naturforsch., 24: 1538-1544 (1969)

SEKIMIZU, K.; D. MIZUNO; S. NATORI:

Localization of a Factor Stimulating RNA Polymerase II in the Nucleoplasm, Revealed by Immunofluorescence.
Exp. Cell. Res., 124: 63-72 (1979)

SENTENAC, A.; S. DEZELEE; F. IBORRA; J.M. BUHLER; H. HUET; F. WYERS; A. RUET und P. FROMAGEOT:

Yeast-RNA-Polymerases.
In: RNA-Polymerases.
(Eds.: R. Losick, M. Chamberlin) Cold Spring Harbor Lab., 330-348 (1976)

SMITH, K.A.:

T-Cell Growth Factor.
Immunol. Rev., 51: 337-366 (1980)

SMITH, K.A.; P.E. BAKER; S. GILLIS und F.W. RUSCETTI:

Functional and Molecular Characterization of T Cell Growth Factor.
Mol. Immunol., 17: 579-585 (1980)

SMITH, K.A.; L.B. LACHMANN; J.J. OPPENHEIM und M.F. FAUATA:

The Functional Relationship of the Interleukins.
J. Exp. Med., 151: 1551-1559 (1980)

SOLBACH, W.; M. RÖLLINGHOFF; H. WAGNER:

Die Rolle von Interleukin-2 bei der Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphocyten.
Klin. Wochenschr., 61: 67-75 (1983)

STRAUSSER, J.L.; S.A. ROSENBERG:

In Vitro Growth of Human Cytotoxic Lymphocytes.
Growth of Cells Sensitized in Vitro to Alloantigens.
J. Imm., 121: 1491-1495 (1978)

TING, D.-C.; S.S. YANG; M.E. HARGROVE:

Effect of Interleukin 2 on Cytotoxic Effectors.
Cell. Imm., 73: 275-281 (1982)

TILLYER, C.R.; P.H.W. BUTTERWORTH:

The Relationship between the Activities of Different Pools of RNA Polymerases I and II During PHA-stimulation of Human Lymphocytes.
Nucleic Acids Res., 5: 2099-2111 (1978)

WAGNER, H.:

Synergy During in Vitro Cytotoxic Allograft Responses.
I. Evidence for Cell Interaction between Thymocytes and Peripheral T Cells.
J. Exp. Med., 138: 1379-1397 (1973)

WAGNER, H.; M. RÖLLINGHOFF:

T-T-Cell Interactions during in Vitro Cytotoxic Allograft Responses.
I. Soluble Products from Activated Ly 1^+ T Cells Trigger Autonomously Antigen-primed Ly 23^+- T Cells to Cell Proliferation and Cytolytic Activity.
J. Exp. Med., 148: 1523-1538 (1978)

WAGNER, H.; C. HARDT; K. HEEG:

T-T-Cell Interactions During Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) Responses: T-Cell Derived Helper Factor (Interleukin 2) as a Probe to Analyse CTL Responsivness and Thymic Maturation of CTL Progenitors.
Imm. Rev., 51: 215-222 (1980)

WARREN, H.S.; R.G. PEMBREY:

A Method for the Production and Quantitative Assay of Human Lymphokine preparations.
J. Imm. Meth., 41: 9-16 (1981)

WATSON, J.:

Continuous Proliferation of Murine Antigen-specific Helper T Cells in Culture.
J. Exp. Med., 150: 1510-1516 (1979)

WEINMANN, R.; R.G. ROEDER:

Role of DNA-dependent RNA-Polymerase III in the Transcription of the t RNA and 5 S RNA Genes.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71: 1790-1794 (1974)

WEISS, S.B., L. GLADSTONE:

A Mammalian System for the Incorporation of Cytidine Triphosphate into Ribonucleic Acid.
J. Am. Chem. Soc., 81: 4118-4123 (1959)

WELTE, K.; C.Y. WANG; R. MERTELSMANN; S. VENUTA; S.P. FELDMAN und M.A.S. MOORE:

Purification of Human Interleukin 2 to Apparent Homogeneity and its Molecular Heterogeneity.
J. Exp. Med., 156: 454-464 (1982)

YAMAMOTO, J.K.; W.L. FARRAR; H.M. JOHNSON:

Interleukin 2 Regulation of Mitogen Induction of Immune Interferon (IFN γ) in Spleen Cells and Thymocytes.
Cell. Imm., 66: 333-341 (1982)

Abkürzungsverzeichnis:

∝-A.	∝-Amanitin
CF	Cytoplasma-Fraktion
Con A	Concanavalin A
cpm	counts per minute
CTL	Cytotoxische T-Zelle
DF	DNA-Fraktion
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoroisothiocyanat
HLA	Human-Lymphocyte-Antigen
HTL - T_H	T-Helfer-Zelle
IL 1	Interleukin 1
IL 2	Interleukin 2
KF	Kernplasma-Fraktion
LAF	Lymphocyte Activating Factor
MHC	Mixed Histocompatibility Comp lex = Haupthistokompatibilitätskomplex
MLC	Mixed Lymphocyte Culture = Lymphocyten-Mischkultur
MLR	Mixed Lymphocyte Reaction = Gemischte Lymphocyten Reaktion
NAGO	Neuraminidase-Galactoseoxidase
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
PHA	Phytohaemagglutinin
RNA	Ribonucleinsäure
RNA-P.	RNA-Polymerase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
STL T_S	T-Suppressor-Zellen
T_1, T_2, T_3, T_8	T-Zell-spezifische Antigene
TCGF IL 2	T-Zell-Growth-Factor = T-Zell-Wachstumsfaktor, frühere Bezeichnung für IL 2
T_H, T_S	T-Helfer-Zelle, T-Suppressor-Zelle

Zu großem Dank bin ich der Konrad-Adenauer-Stiftung, St. Augustin, verpflichtet, dank deren freundlicher Unterstützung diese Arbeit entstehen konnte.

Herrn Prof. Dr. H. Egli danke ich für die Vergabe des Dissertationsthemas und die Möglichkeit zur Anfertigung der Arbeit im Institut für Experimentelle Hämatologie und Bluttransfusionswesen.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. M. Kessler für die Anregungen, sowie die großzügige und unermüdliche Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. N. Müller und Herrn Priv. Doz. Dr. H. Hahn danke ich für die konstruktiven Anregungen bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. H.G. Trüper für sein freundliches Interesse an meiner Weiterbildung danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Labors Frau H. Hoffmann und Frau H. Seifert, die immer für ein gutes Arbeitsklima gesorgt und somit zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Schließlich gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts, die mir in irgendeiner Weise behilflich waren.

Lebenslauf

1. April 1956	geboren in Köln-Mülheim Vater: Dr. rer. nat. Walter Krauß Mutter: Elfrid, geb. Wallenfels
1963 - 1966	Besuch der Grundschule in Leverkusen-Mathildenhof
1966 - 1973	Besuch des Neusprachlichen Gymnasiums Ina-Seidel-Schule in Opladen
1973 - 1975	Besuch der Landrat-Lucas-Schule I in Opladen
18. 06. 1975	Abitur
22. 09. 1975	Immatrikulation an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn im Fach Biologie mit Studienziel Diplom
04. 11. 1977	Vordiplom in den Fächern Botanik, Zoologie, Physik und Chemie
17. 08. 1981	Diplom in den Fächern Mikrobiologie, Genetik und Chemie Die Diplomarbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universität Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. G. Schallehn angefertigt. Sie trug den Titel: "Charakterisierung eines Bacteriocins von Clostridium sporogenes C 71"
1981 - 1984	Durchführung der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation
Seit 25. 08. 83	verheiratet mit Dr. med. Nobert Petruschke